

CALCIUM-INDUZIERTE CHLORIDSEKRETION AN ISOLIERTEN KRYPTEN AUS DEM KOLON DER RATTE

BRITTA HENNIG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

Calcium-induzierte Chloridsekretion an isolierten Krypten aus dem Kolon der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Britta Hennig

Tierärztin aus Wiesbaden

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. R. Neiger

Tag der Disputation: 28.06.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
--------------------------	---

Abkürzungen	IV
-------------------	----

I Einleitung	1
1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau des Kolons.....	1
2 Elektrolyttransport am Kolon.....	4
2.1 Resorptionsmechanismen am Kolon	4
2.2 Sekretionsmechanismen am Kolon	6
2.3 Regulation der Sekretion am Kolon	7
2.3.1 cAMP und cGMP	8
2.3.2 PLC-IP ₃ -Ca ²⁺ -Signalweg	9
2.3.3 Der Calcium/Calmodulin-Weg.....	11
2.4 Chloridkanäle am Kolon.....	12
2.4.1 CFTR	12
2.4.2 CaCC - calciumaktivierte Chloridkanäle.....	13
3 Eigene Fragestellung.....	16
II Material und Methoden.....	17
1 Versuchstiere	17
2 Verwendete Lösungen.....	17
2.1 Lösungen für die Kryptenisolation	17
2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung	17
2.1.2 Isolationslösung	17
2.1.3 Auffang-Tyrode	18
2.2 Lösungen für die Imagingversuche.....	18
2.2.1 DiH-MEQ-Lösung.....	18
2.2.2 NaCl-Lösung	18
2.2.3 KCl-Lösung	19
2.2.4 KGluc-Lösung	19
2.2.5 Eichlösungen	19
2.3 Lösungen für die Immunhistochemie.....	20
2.3.1 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung	20
2.3.2 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung	20
2.3.3 Phosphatpuffer (= PB)	20
2.3.4 Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung	20
2.3.5 Blockinglösung.....	21
2.3.6 Primärantikörperlösung.....	21
2.3.7 Sekundärantikörperlösung	21
2.3.8 DAPI (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat)-Lösung.....	21

2.4	Lösungen für die Ussingkammer-Messungen	22
2.4.1	KCl-Lösung	22
2.4.2	KGluc-Lösung	22
3	Substanzen	23
4	Die Gewebepreparation	25
4.1	Die Präparation der Darmschleimhaut	25
4.2	Die Präparation isolierter Krypten	26
5	Die Imaging-Technik	27
5.1	Der halogenidsensitive Farbstoff MEQ	27
5.2	Herstellung von DiH-MEQ aus MEQ	29
5.3	Kalibrierung der Fluoreszenz per Doppel-Ionophor-Technik	30
5.4	Die Ionophoren	33
5.4.1	Tributylzinn-Chlorid (TBT)	33
5.4.2	Nigericin	34
5.4.3	Valinomycin	35
5.5	Der Imagingstand	36
5.5.1	Mikroskop und elektrische Komponenten	36
5.5.2	Messkammern und Perfusionssystem	37
5.6	Die Imaging-Experimente	39
5.6.1	Aufladung der Krypten	39
5.6.2	Versuchsdurchführung	39
5.6.3	Stimulantien	41
5.6.4	Inhibitoren	42
5.7	Datenerfassung	43
6	Histochemische Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz	43
6.1	Grundlagen der Immunfluoreszenz	43
6.2	Fluoreszenzmarkierung	45
6.2.1	Kryofixierung des Gewebes	45
6.2.2	Herstellung der Gewebeschnitte	45
6.2.3	Das Färbeprotokoll	46
6.2.4	Verwendete Antikörper	47
6.3	Mikroskopie	48
7	Die Ussingkammer-Technik	49
7.1	Die Messkammer	49
7.2	Elektrische Messungen	50
7.3	Versuchsdurchführung und Datenerfassung	53
8	Statistik	55
III	Ergebnisse	56
1	Das Versuchsprotokoll: Messungen unter depolarisierten Bedingungen	56

1.1	Aktivierung eines Chloridausstromes durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	57
1.2	Beteiligung von CaCC-Kanälen an der Carbachol-induzierten Chloridsekretion	59
1.3	Kryptenachse	61
1.4	Vergleich mit Forskolin	63
2	Signaltransduktion	66
2.1	Die „klassischen“ Ca^{2+} -Signalkaskaden	66
2.1.1	Calcium/Calmodulin- Weg und Phospholipase C-Signalkaskade	66
2.2	Alternativer Signalweg: NO-Synthasen (NOS)	68
2.2.1	Funktionelle Bedeutung der NOS in der Signalkaskade	68
2.2.2	Immunhistochemische Lokalisation der NOS-Isoformen	70
2.3	Das Cytoskelett	74
2.3.1	Einfluss der Mikrotubuli auf den CaCC	74
2.3.2	Einfluss der Actinfilamente auf den CaCC	77
IV	Diskussion	79
1	Stimulation einer Chloridleitfähigkeit an isolierten Krypten	79
2	Calciumabhängigkeit der Chloridleitfähigkeit	81
3	Kryptenachse	82
4	Signalkaskade	83
5	Stickstoffmonoxid als second messenger	84
6	Das Cytoskelett	87
7	Zellmodell	90
V	Zusammenfassung	91
VI	Summary	93
VII	Abbildungsverzeichnis	95
VIII	Tabellenverzeichnis	95
IX	Literaturverzeichnis	96
X	Danksagung	105
XI	Erklärung	106

Abkürzungen

Δ	Änderung eines Parameters (Delta)
$\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	Einheit des Kurzschlussstroms (Fluss eines einwertigen Ions pro Zeit und Fläche mit $1\ \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)
$[\text{Cl}^-]_i$	Intrazelluläre Chloridkonzentration
ACh	Acetylcholin
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
aPKC	Atypische Proteinkinase C (atypical PKC)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCC	Calciumaktivierte Chloridkanäle
CaM	Calmodulin
CaMK	Calmodulinkinase
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CCD	charge-coupled device
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
cGMP	Cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
ClCa	Familie von Proteinen, die vermutlich die calciumaktivierten Chloridströme vermitteln
cPKC	Konventionelle Proteinkinase C (conventional PKC)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat (Farbstoff zur Darstellung von Zellkernen)
DiH-MEQ	Di-Hydro-6-methoxy-N-ethylchinolin Jodid
DIDS	4,4'-Diisothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonsäure Dinatriumsalz
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
e-NOS	Endotheliale Form der NO-Synthase (NOS-3)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
F _{ab}	Antigen-bindende Region eines Antikörpers
F _c	Kristalline Region eines Antikörpers
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
Gew/Vol	Gewichtsanteil (Gewicht/Volumen)
GMP	Guanosin-5'-Monophosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G _t	Gewebeleitfähigkeit („t“ = tissue; Einheit: mS·cm ⁻²)
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
i-NOS	Induzierbare Form der NO-Synthase (NOS-2)
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-Trisphosphatrezeptor
I _{sc}	Kurzschlussstrom (short-circuit current, Einheit: μEq·h ⁻¹ ·cm ⁻²)
KGluconat	Kaliumgluconat
MEQ	6-Methoxy-N-ethylchinolin Jodid
min	Minute
MQAE	6-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxychinolin Bromid
NaBH ₄	Natriumborohydrid
NBD	nuclear binding domain
NGS	Normales Ziegenserum (normal goat serum)
NMR	Kernmagnetische Resonanz
n-NOS	Neuronale Form der NO-Synthase (NOS-1)
NOS	NO-Synthasen
nPKC	Neue Proteinkinase C (novel PKC)

OAG	Oleolyl-2-acetyl-sn-glycerol
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
Pd	Transepitheliale Potenzialdifferenz
PKA/C/G	Proteinkinase A/C/G
pS	pico Siemens
r	Radius
ROI	Messfeld (region of interest)
RT	Raumtemperatur
R_t	Gewebewiderstand („t“ = tissue; Einheit: $\Omega \cdot \text{cm}^2$)
rt PCR	reverse transcription Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonsäure Dinatriumsalz
SPQ	6-Methoxy-N-(3-sulfopropyl)chinolin
TAE-Puffer	Trisacetat-Puffer
TBT	Tributylzinn (tributyltin chloride)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
Vol/Vol	Volumenanteil (Volumen/Volumen)

I Einleitung

1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau des Kolons

Der Gastrointestinaltrakt nimmt in seiner Gesamtheit essentielle Aufgaben für den menschlichen und tierischen Organismus wahr. Unter anderem findet der Großteil der Verdauung und Aufnahme der Nährstoffe speziesspezifisch im Magen und im Dünndarm statt. Die Hauptaufgabe des Dickdarms hingegen liegt in der Resorption von Wasser und Elektrolyten. Ca. 90 % der aus dem Dünndarm in den Dickdarm gelangten Flüssigkeit werden hier resorbiert (Cooke 1991). Demgegenüber steht eine deutlich geringere Sekretion einer plasmamaisotonen, K^+ -, HCO_3^- - und Muzin-haltigen Flüssigkeit.

Makroskopisch werden am Dickdarm Caecum, Kolon, Rectum, Ampulla recti und der Analkanal unterschieden. Alle Abschnitte sind je nach Spezies unterschiedlich entwickelt. Der für den Menschen typische Wurmfortsatz (Appendix vermiformis) zum Beispiel fehlt den so genannten Haussäugetern Hund, Katze, Pferd, Rind und Schwein. In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Proben aus dem distalen Kolon der Ratte entnommen.

In der mikroskopischen Betrachtung stellt sich die Dickdarmwand als häutig-muskulärer Schlauch dar. Von luminal nach serosal finden sich die Tunica mucosa, die Tela submucosa, gefolgt von der Tunica muscularis, die wiederum von der Tunica serosa bedeckt ist. Neuronale und vaskuläre Strukturen ziehen ungehindert durch alle Anteile (Übersicht siehe: Christensen 1991).

Typisch für die Schleimhaut (Tunica mucosa) des Dickdarmes ist, dass Darmzotten gänzlich fehlen. Die innere Auskleidung der Wand ist somit glatt und lediglich durchbrochen von sich in die Tiefe einstülpenden Glandulae intestinales (Lieberkühn'sche Krypten). Diese liegen langgestreckt und dicht

platziert in der Lamina propria mucosae. Proximal bestehen die Krypten aus hochprismatischen Epithelzellen. Die Saumzellen der inneren Darmschleimhaut (Enterocyten) besitzen einen dichten Bürstensaum aus regelmäßigen Mikrovilli. Je weiter man der Kolonachse nach distal folgt, desto höher ist der Anteil der Becherzellen, die für die Sekretion von Schleim verantwortlich sind. Die Epithelzellen unterliegen einer ständigen Erneuerung. Undifferenzierte Zellen reifen auf ihrem Weg von der Kryptenbasis an die Oberfläche und ersetzen dort abgestoßene Epithelzellen. Neben diesen beiden Zelltypen existieren noch die enteroendokrinen Zellen. Sie sind denen des Dünndarmes sehr ähnlich, kommen jedoch in kleinerer Anzahl vor. Sie sezernieren unter anderem Somatostatin, Glucagon und Serotonin (Übersicht siehe: Christensen 1991). Schließlich wird die gesamte Schleimhaut von der Lamina muscularis mucosae umgeben (König & Liebig 1999).

Die sich anschließende Tela submucosa besteht vorrangig aus lockerem Kollagenstroma und elastischen Fasern. Im Stroma sind verschiedenste Zellen zu finden, wie zum Beispiel Fibroblasten und Makrophagen. Äste der reichlich vorhandenen Arterien und Venen ziehen sowohl in die Tunica mucosa als auch in die Lamina muscularis mucosae. Auch nervöse Strukturen sind zu finden, nämlich die Ganglien des Plexus submucosus (Meissner), die meist in zwei Schichten vorliegen. Sie sind über fibrilläre Bündel miteinander verbunden und entlassen Axone in die beiden angrenzenden Wandabschnitte.

Die Tunica muscularis ist zweischichtig aufgebaut. Die Muskelzellbündel der äußeren Schicht verlaufen longitudinal zur Darmachse, während die der inneren Schicht das Organ zirkulär umziehen. Entsprechend werden sie als Stratum longitudinale bzw. circulare bezeichnet. Beide Schichten sind durch den intermuskulären Raum voneinander abgegrenzt. Dieser besteht nicht nur aus Bindegewebe, sondern auch aus nervalen

Anteilen, wie dem Plexus myentericus (Auerbach). Dieser setzt sich aus großen Ganglien mit jeweils mehr als 100 Nervenzellen zusammen.

Der seröse Überzug des Organs, das Mesothelium, besteht aus squamösen Epithelzellen und ist durch lockeres Gewebe mit der darunterliegenden Muskelschicht verbunden. Typisch für den Bereich des Kolons sind unter dem Mesothelium befindliche Fettzellaggregate (Übersicht siehe: Christensen 1991).

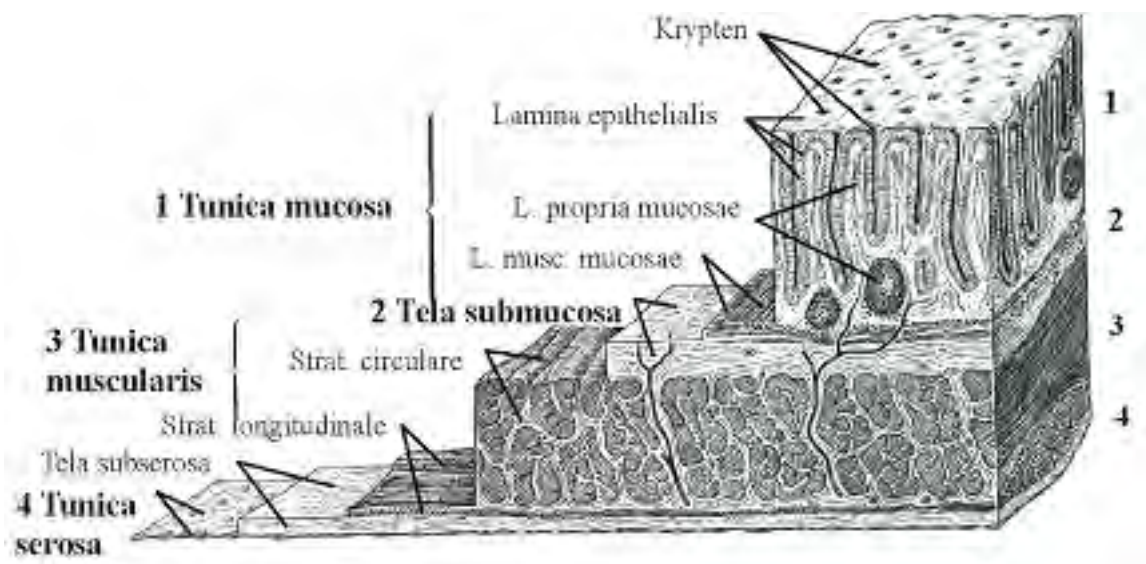


Abb. I.1: Schematische Darstellung der Kolonwand.

Lupenvergrößerung (nach Sobotta & Becher 1972). L.= Lamina, Strat.= Stratum

2 Elektrolyttransport am Kolon

Das Kolonepithel stellt ein typisches Elektrolyte-transportierendes Epithel dar. Große Mengen an Salzen und Wasser werden täglich von mucosal nach serosal, aber auch vice versa verschoben. Besonders durch die enorme Resorptionsleistung, beim Menschen täglich zwischen 1,3 - 1,8 Liter Flüssigkeit, stellt es einen wichtigen Garanten für einen optimalen Flüssigkeitshaushalt des Organismus dar (Übersicht siehe: Kunzelmann & Mall 2002). Dies wird vor allem dann deutlich, wenn die Transportmechanismen krankheitsbedingt außer Kontrolle geraten. Nicht selten kommt es zu einer forcierten Sekretion, deren Folge eine starke Dehydratation sein kann, die vor allem im Säuglingsalter spezieübergreifend lebensgefährliche Ausmaße annehmen kann.

2.1 Resorptionsmechanismen am Kolon

Die Hauptaufgabe des Kolons besteht in der Resorption von Ionen, vor allem Na^+ , K^+ und Cl^- . Die dazu benötigten Transportmechanismen werden in dem folgenden Abschnitt beschrieben und sind in Abbildung I.2 noch einmal bildlich zusammengefasst.

Zur Aufnahme von Na^+ existieren sowohl elektroneutrale als auch elektrogene Transportmöglichkeiten. Bei der Ratte dominiert der elektroneutrale Transport für Na^+ . Beim Menschen hingegen wurde beobachtet, dass die Form des Transportes am jeweiligen Kolonabschnitt unterschiedlich gewichtet ist. Während im proximalen Abschnitt die Resorption zum Großteil elektroneutral erfolgt, überwiegt im distalen Abschnitt der elektrogene Transport.

Für den elektroneutralen Transport von Natriumionen arbeiten ein

apikaler Na^+/H^+ -Austauscher und ein ebenfalls apikaler $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher parallel. Dabei werden Na^+ und Cl^- in die Zelle aufgenommen und H^+ und HCO_3^- sezerniert. Basolateral werden Na^+ und Cl^- daraufhin über die Na^+/K^+ -ATPase bzw. Chloridkanäle ausgeschleust (Diener *et al.* 1992; Übersicht siehe: Kunzelmann & Mall 2002; Ikuma *et al.* 2003). Der elektrogene Transport erfolgt über apikal lokalisierte epitheliale Natriumkanäle (= ENaC). ENaCs bestehen aus drei Untereinheiten ($\alpha\beta\gamma$) und sind amiloridsensitive, für Na^+ hochselektive Kanäle (Übersicht siehe: Staub *et al.* 1997; Kunzelmann & Mall 2002). Die aktive Kaliumresorption über einen ATP verbrauchenden Transport wird durch zwei Typen der K^+/H^+ -ATPase vermittelt. Zur Unterscheidung der Typen wird ihre unterschiedliche Sensitivität auf Ouabain und Omeprazol herangezogen. Das apikal aufgenommene Kalium gelangt über basolaterale K^+ -Kanäle und über den elektroneutralen KCl-Kotransporter KCC1 ins Blut (Übersicht siehe: Kunzelmann & Mall 2002).

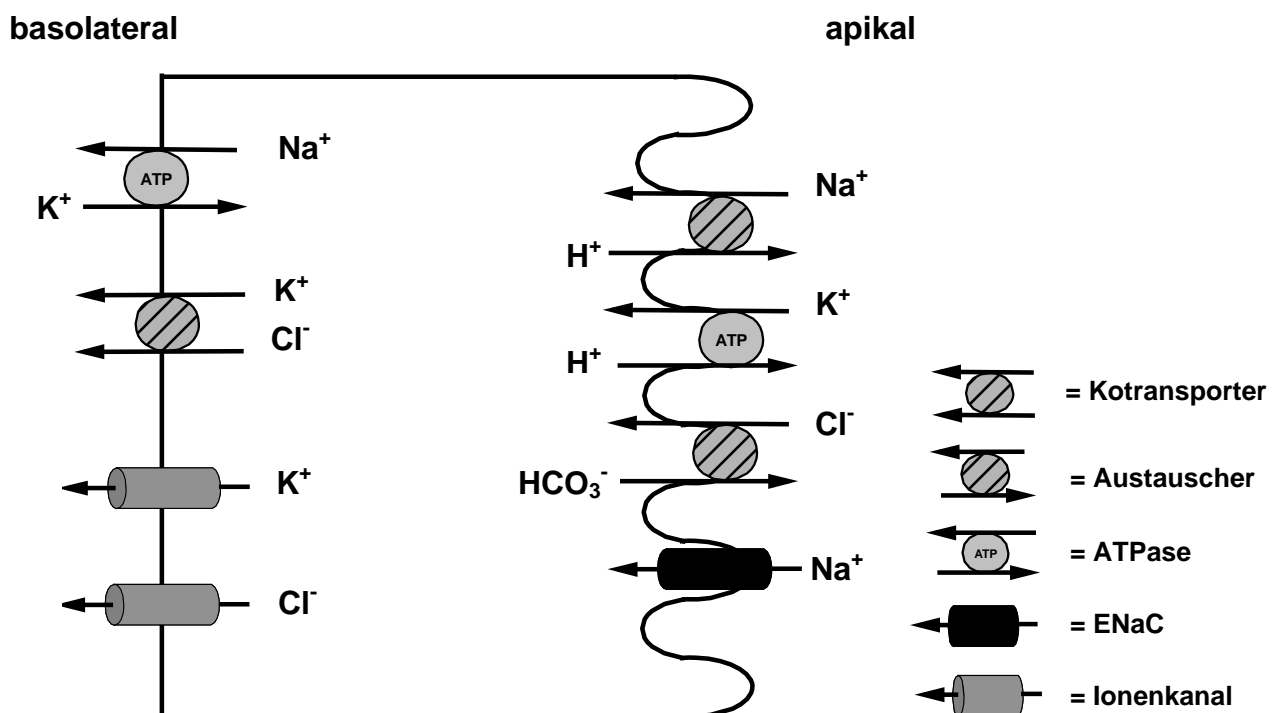


Abb. I.2: Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Resorption von Natrium, Kalium und Chlorid.

2.2 Sekretionsmechanismen am Kolon

Wie die Resorption gehört auch die Sekretion zu den physiologischen Aufgaben des Kolons. Dazu bringt eine basolaterale Na^+/K^+ -ATPase Kaliumionen im Austausch gegen Natriumionen in die Enterozyten. Die Reduktion der intrazellulären Na^+ -Konzentration liefert die Antriebskraft für einen sekundär aktiven Transporter, den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC1, Übersicht siehe: Barrett & Keely 2000). Dadurch gelangen weitere Kaliumionen sowie Chlorid in die Zelle (Haas & Forbush 2000). Zusätzlich existieren basolateral lokalisierte Kaliumkanäle, die das Recycling von K^+ erlauben, die Zelle vor Depolarisierung schützen und einen elektrischen Gradienten für eine Chloridsekretion aufbauen (Übersicht siehe: Barrett & Keely 2000; Sangan *et al.* 2000). Chlorid akkumuliert in der Zelle über sein elektrochemisches Gleichgewicht hinaus und nach Öffnung apikaler Chloridkanäle wird es in das Kolonlumen sezerniert.

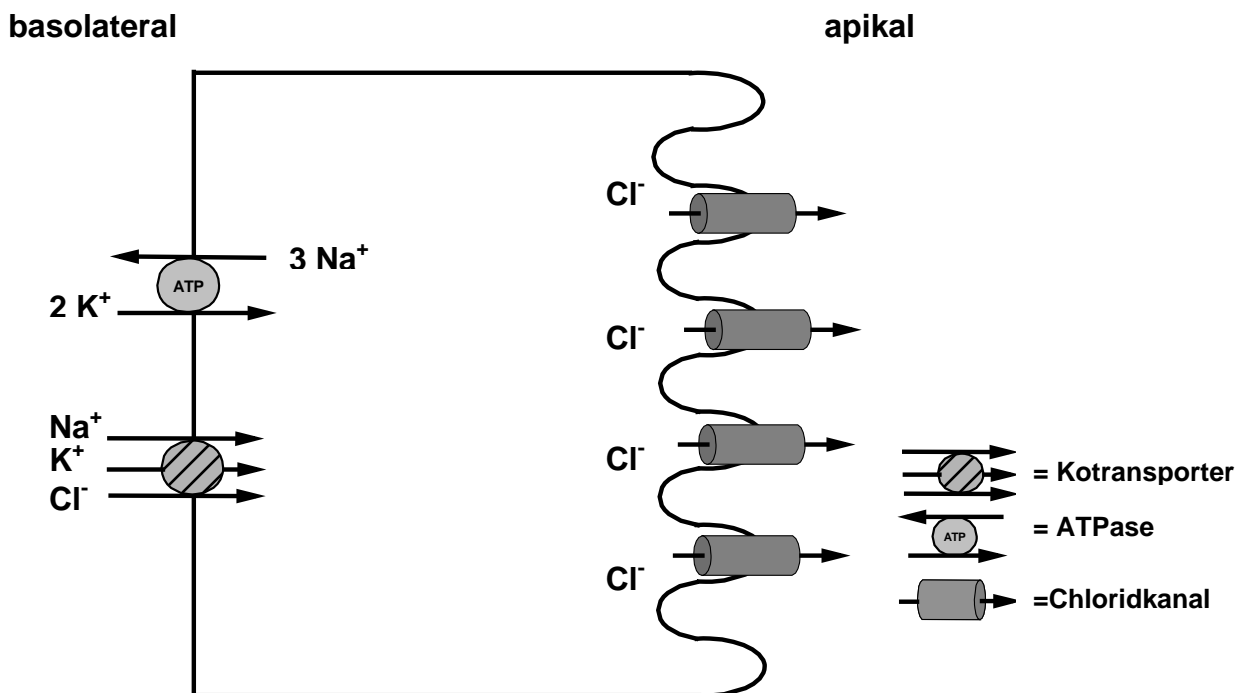


Abb. I.3: Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Sekretion von Chlorid.

Im Zuge eines Ladungsausgleichs folgt der Chloridsekretion ein parazellulärer Ausstrom von Natriumionen. Der lumenwärtige Elektrolyttransport führt schließlich zum Aufbau eines osmotischen Gradienten. Dadurch angetrieben strömt Wasser in das Kolonlumen (Übersicht siehe: Barrett & Keely 2000).

2.3 Regulation der Sekretion am Kolon

Als extrazelluläre Sekretagoga fungieren beispielsweise das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP), Acetylcholin (ACh), Prostaglandine oder ATP (Binder *et al.* 1991; Singh *et al.* 1995; Greger 2000). Auch die Dehnung der Kolonwand hat die Sekretion von Chlorid zur Folge (Diener & Rummel 1990). Pathophysiologische Bedeutung besitzen vor allem Enterotoxine wie das Vibrio cholerae Toxin, hitzestabiles Escherichia coli Toxin und Clostridium difficile Toxin (Übersicht siehe: Barrett & Keely 2000; Greger 2000).

Einige dieser Sekretagoga binden als Liganden an zelloberflächenassoziierte G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die mit G-Proteinen interagieren. Zumeist handelt es sich bei den GPCR um heptahelicale Rezeptoren, aber auch einige nicht-heptahelicale Rezeptoren scheinen mit G-Proteinen zu kommunizieren (Landry *et al.* 2006). Die Bindung eines Liganden an den GPCR aktiviert das G-Protein entweder über Stabilisierung oder Konformationsänderung des Proteins. Bei Säugetieren sind bislang 20 verschiedene G-Proteine bekannt, die jeweils eine spezifische α -Untereinheit besitzen, welche an eine β - und eine γ -Untereinheit gebunden ist. Im inaktiven heterotrimeren Zustand ist GDP an $G\alpha$ gebunden. Nach Aktivierung des G-Proteins wird GDP freigesetzt und durch GTP ersetzt. Daraufhin dissoziiert α -GTP von dem Rezeptor, von $G\beta$ und von $G\gamma$. Sowohl α -GTP als auch $G\beta$ und $G\gamma$ aktivieren Effektorproteine (Malbon 2005; Landry

et al. 2006). Dazu gehören zum Beispiel die Phospholipase C, die zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt, oder auch die Adenylatcyclase, zuständig für die Synthese von cAMP.

Anders verhält es sich mit dem cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP). Hier bindet der Ligand an einen Rezeptor mit enzymatischer Aktivität, in diesem Fall an eine Guanylatcyclase. Dadurch kommt es zur Synthese von cGMP und das Signal wird ins Zellinnere übermittelt (Lodish *et al.* 2001).

Ca^{2+} , cAMP und cGMP agieren folglich als intrazelluläre Botenstoffe, die an der Zelloberfläche registrierte Signale weiterleiten und daher als *second messenger* bezeichnet werden.

2.3.1 cAMP und cGMP

Nach Stimulation der Adenylatcyclase durch ein G-Protein kommt es zur Bildung von cAMP aus ATP. Ein Wirkungsort für cAMP in Enterozyten ist der CFTR (= Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), der als Chloridkanal in der apikalen Membran fungiert, und damit die Aktivierung der Sekretion von Chlorid. Gleichzeitig erfolgt die Öffnung basolateraler K^{+} -Kanäle des Typs K_vLQT_1 , wodurch die elektrische Austriebskraft für den Chloridausstrom erhöht wird (Übersicht siehe: Greger 2000). Über den cAMP-Weg werden außerdem der $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher direkt und der ENaC indirekt gehemmt (Binder *et al.* 1991; Mall *et al.* 1999).

Das cGMP ahmt in Enterocyten die Wirkung von cAMP nach. Die genauen Signalwege sind allerdings noch nicht bekannt. Vermutet wird, dass cGMP über die cGMP regulierte Proteinkinase II (PKG II) den CFTR aktiviert. Außerdem scheint cGMP eine Phosphodiesterase zu hemmen und dadurch einen Anstieg des cAMP-Spiegels zu bewirken (Übersicht siehe: Markert *et al.* 1995; Greger 2000).

2.3.2 PLC-IP₃-Ca²⁺-Signalweg

Durch Bindung des Muscarin- und Nikotin-Agonisten Carbachol, eines stabilen Acetylcholinderivats, an einen GPCR kommt es zur Aktivierung der oben beschriebenen Signalweiterleitung, die schließlich in der Aktivierung der Phospholipase C mündet, wodurch der PLC-IP₃-Ca²⁺-Signalweg angestoßen wird (Fischer *et al.* 1992; Frings *et al.* 1999). Hierbei nimmt das Enzym Phospholipase C den Platz des Effektors ein. Bei den Säugetieren sind bislang drei Hauptgruppen der Phospholipase C (PLC β , PLC γ , PLC δ) bekannt, von denen jeweils mehrere Isoformen existieren. Außerdem wurden eine Vielzahl von Spleißvarianten beschrieben. Die PLC spaltet Inositol-Phospholipide (PI, PIP, PIP₂, PIP₃) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Phosphate, wie zum Beispiel Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) (Dennis *et al.* 1991; Übersicht siehe: Rebecchi & Pentyala 2000).

Vermittelt über Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptoren (IP₃R) setzt IP₃ Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei und führt dadurch zu einer Anreicherung von Ca²⁺ im Zytoplasma. Es kommt zur Aktivierung der basolateralen und apikalen Kaliumkanäle und somit zu einer starken Kaliumsekretion (Schultheiss & Diener 1997; Schultheiss *et al.* 2003). Bedingt durch diesen Kaliumefflux nähert sich das Membranpotenzial dem Kalium-Gleichgewichtspotenzial an, woraus eine Hyperpolarisation der Zellmembran resultiert. Die Potenzialänderung erhöht wiederum die Austriebskraft für den Chloridausstrom über Chloridkanäle und Chlorid wird in das Kolonlumen sezerniert (siehe Abb. I.4, Böhme *et al.* 1991; Strabel & Diener 1995; Bleich *et al.* 1996; Hartzell *et al.* 2005).

basolateral

apikal

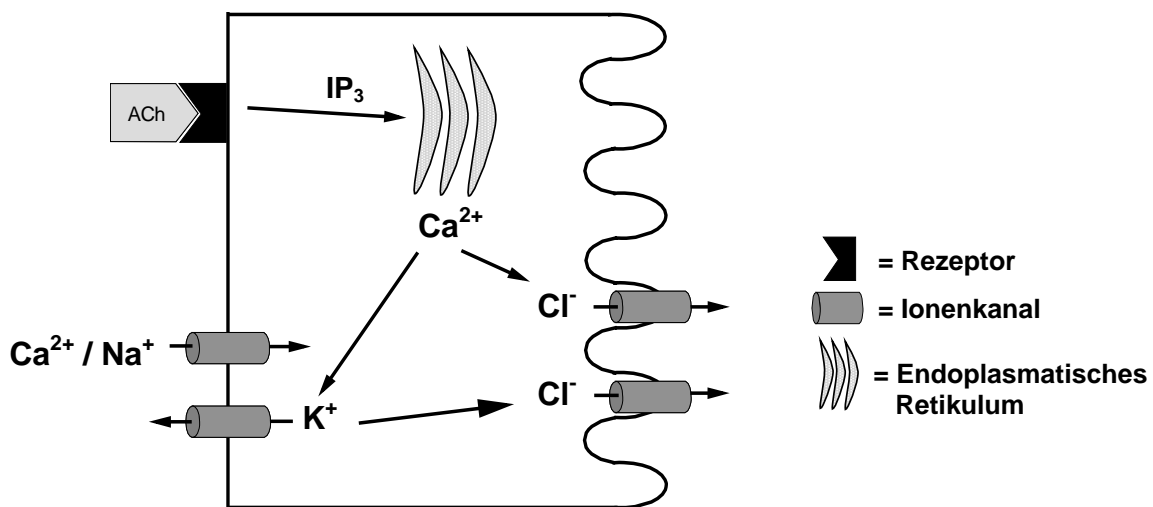


Abb. I.4: Calcium-vermittelte Chloridsekretion nach muscarinischer Stimulation.

Nach der Stimulation durch Acetylcholin (ACh) wird die IP₃-Signalkaskade angestoßen. Daraufhin wird Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und die cytosolische Calciumkonzentration erhöht. Ein basolateraler nicht-selektiver Kationenkanal in der Plasmamembran öffnet sich. Das Calcium aktiviert basolateral gelegene Kaliumkanäle, wodurch es zum Kaliumausstrom und zur Hyperpolarisation der Zelle kommt. Dadurch steigt die Antriebskraft für den Chloridausstrom über spontan offene apikale Chloridkanäle. Zusätzlich aktiviert das Calcium direkt einen apikalen calciumabhängigen Chloridkanal.

DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die Proteinkinasen sind an der Auslösung einer Vielzahl zellulärer Mechanismen beteiligt. Dazu gehören vor allem die Aktivierung von Kanälen, Ionenpumpen und Rezeptoren. Die bisher identifizierten Isoformen der PKC werden in drei Gruppen eingeteilt, die klassischen oder konventionellen PKC (cPKC), die neuen PKC (nPKC) und die atypischen PKC (aPKC). Davon ist lediglich die klassische cPKC direkt Calcium-abhängig (Wilkinson & Hallam 1994; Nishizuka 1995).

2.3.3 Der Calcium/Calmodulin-Weg

Calmodulin (CaM) ist einer der wichtigsten Sensoren für Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration und deren Übersetzung in biochemische Signale (Choi & Cooke 1992). Es handelt sich dabei um ein 19 kDa großes, ubiquitär im Organismus vorkommendes Protein. Pro mol Calmodulin können vier mol Calcium gebunden werden, wobei zuerst die beiden Bindungsstellen am Carboxylterminus und anschließend, mit geringerer Affinität, die zwei Bindungsstellen am Aminoternus des Proteins besetzt werden.

Die Bindung von Calcium bewirkt eine Konformationsänderung von Calmodulin. Der resultierende Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex löst verschiedene Ca^{2+} -abhängige zelluläre Mechanismen aus und aktiviert Ca^{2+} /CaM-abhängige Enzyme. Zu diesen Enzymen gehören unter anderem die Calmodulinkinasen (CaMK). Die CaMK werden in zwei Gruppen unterschieden. So gibt es die streng substratspezifischen CaMKs, wie zum Beispiel die *Myosin light chain kinase*, die Phosphorylasekinase und die CaMK III. Die zweite Gruppe besteht aus den multifunktionalen CaMK, die ein wesentlich breiteres Spektrum an Substraten bedienen und somit bei sehr vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind (Ishida *et al.* 2003). Zu dieser letzten Gruppe gehört auch die CaMK II, die bei Epithelien der Atemwege, an T-Lymphocyten, humanen Makrophagen und bei der humanen Kolon Tumor-Zelllinie T84 an der Regulation von calciumaktivierten Chloridkanälen (CaCC) beteiligt ist (Hartzell *et al.* 2005).

2.4 Chloridkanäle am Kolon

Die Sekretion von Chlorid erfolgt am Kolon größtenteils über cAMP aktivierte CFTR Chloridkanäle (Jentsch *et al.* 2002). Den ebenfalls exprimierten calciumaktivierten Chloridkanälen (ClCa) wurde bislang keine große Bedeutung zugeschrieben.

2.4.1 CFTR

Der CFTR, ein aus einer Peptidkette von 1480 Aminosäuren (= AS) bestehendes membranintegriertes Protein, gehört zur Gruppe der „traffic ATPases“, auch ABC-Transporter genannt. Nach der derzeit weitgehend akzeptierten Topologie besitzt der CFTR zwei transmembranäre Domänen, die jeweils aus sechs Membranhelices und einer *nuclear binding domain* (= NBD) zur Bindung von ATP bestehen. Die transmembranären Domänen sind über eine regulierende R-Domäne miteinander gekoppelt. Innerhalb der ABC-Transporterfamilie stellt diese R-Domäne eine einzigartige Struktur dar. Sie beinhaltet multiple PKA-Phosphorylierungsstellen, von denen allerdings nur sechs *in vivo* Verwendung finden. Der Grad der Phosphorylierung der R-Domäne bestimmt die Affinität der NBDs für ATP. Somit ist sie Voraussetzung zur Öffnung der Kanalpore. Im geschlossenen Zustand haben die NBDs kein ATP gebunden. Nach der Bindung von ATP an beide NBDs kommt es zur Hydrolyse des ATPs an der NBD 1 und der Kanal öffnet sich. Sobald das an die NBD 2 gebundene ATP ebenfalls hydrolysiert und ADP von einer oder beiden NBDs freigesetzt wurde, schließt sich der Kanal wieder.

Die gebildete Pore hat an ihrer engsten Stelle einen Durchmesser von ca. 5,3 - 6 Å und wird von großen intra- und extrazellulären Vestibuli flankiert. Die Einzelkanalleitfähigkeit (*single channel conductance*) des CFTR liegt zwischen 6 - 10 pS (Übersicht siehe: Barrett & Keely 2000; Nilius & Droogmans 2003).

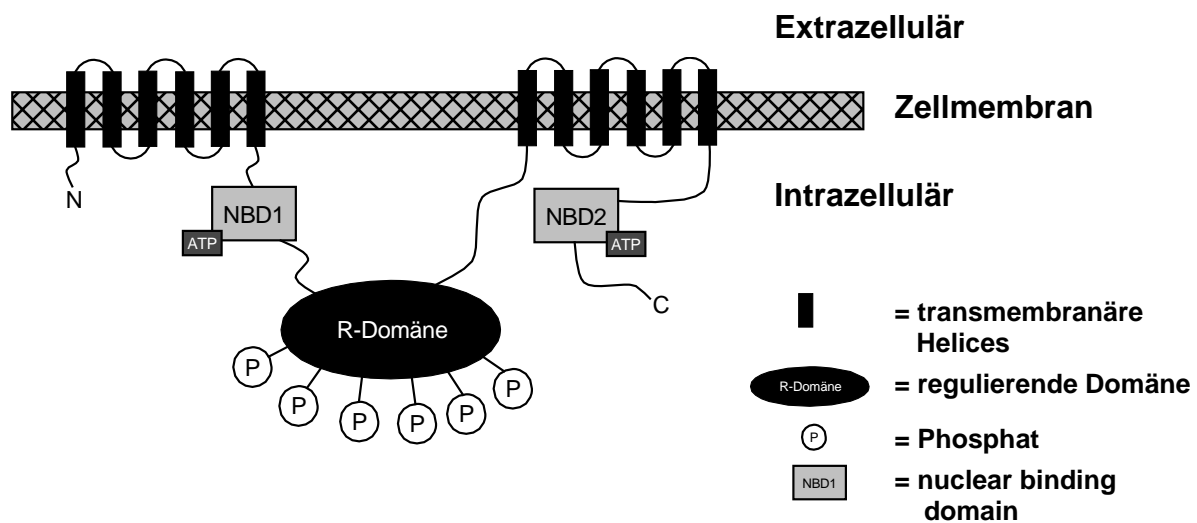


Abb. I.5: Derzeit akzeptierte Topologie des CFTR.

Das Protein besitzt zwei transmembranäre Domänen, die aus zwölf Membranhelices bestehen und die Kanalpore bilden. Zwei *nuclear binding domains* verbinden die transmembranären Domänen mit der regulierenden Domäne und hydrolysieren ATP (modifiziert nach Barrett & Keely 2000).

2.4.2 CaCC - calciumaktivierte Chloridkanäle

In den letzten 25 Jahren konnten calciumaktivierte Chloridkanäle (CaCCs) bereits in vielen Zelltypen nachgewiesen werden. Eine wichtige Rolle spielen sie zum Beispiel bei Geschmacksrezeptoren von Amphibien und Säugetieren, in Neuronen, Myocyten des Herzens, Zellen der Niere sowie in Endothelzellen (Übersicht siehe: Hartzell *et al.* 2005).

In sekretorischen Epithelien des Intestinaltraktes jedoch blieb das Hauptaugenmerk lange Zeit fast ausschließlich auf den CFTR ausgerichtet. Vor einigen Jahren kam es zu einer interessanten Entdeckung. Bei einem Defekt des CFTR kommt es zur Hyperresorption von Natrium und Chlorid. Dies führt vor allem im Respirations- und Gastrointestinaltrakt zu einer verminderten Viskosität von Schleim, wodurch es beim Menschen zu schweren gesundheitlichen Beeinträchtigungen kommt (Pilewski & Frizzell 1999).

Bei Experimenten mit CFTR $-/-$ Knockout-Mäusen stellte man jedoch fest, dass diese nur eine leichte Symptomatik in den Atemwegen entwickelten. Eingehende Untersuchungen zeigten, dass der Chloridtransport durch calciumaktivierte Chloridkanäle kompensiert wurde (Fuller & Benos 2000). Im Jahr 1991 konnte schließlich ein 38 kDa großer Chloridkanal aus bovinem Trachealepithel geklont werden, der sich als direkt calciumaktivierter Chloridkanal darstellte (Ran & Benos 1991).

Trotz intensiver Forschung ist man sich über viele Eigenschaften der CaCCs bis heute noch im Unklaren. Bislang werden CaCCs als Anionenkanäle mit gering ausgeprägter Anionenselektivität gehandelt. Allen CaCCs gemein ist ihre Aktivierung über cytosolisches Ca^{2+} ; ihre molekulare Identität konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden.

Als mögliche Kandidaten gelten die ClCas. 1992 gelang erstmalig das Klonen von ClCa cDNA aus bovinem Trachealgewebe (Ran & Benos 1992). Nach dem derzeitig postulierten Modell handelt es sich bei den ClCas um 125 kDa große „Vorstufen-Proteine“ mit fünf transmembranären Domänen. Intrazellulär befindet sich ein Carboxylterminus (COOH), ein Aminoterminal (NH_2) extrazellulär. Diese Proteine spalten sich dann in ein 90 kDa NH_2 -Fragment und ein 38 kDa COOH -Fragment auf. Erstes beinhaltet die Domänen eins bis drei, das zweite die verbleibenden Domänen vier und fünf.

Unklar ist allerdings noch immer, welcher Teil dieses Proteins für die Kanaleigenschaften verantwortlich ist. Auch gestaltet es sich in einigen Gewebetypen schwierig, gemessene calciumaktivierte Chloridströme in Verbindung mit der Expression von ClCas zu bringen. So gelang es zum Beispiel einen typischen CaCC-Strom in Ehrlich-Tumor-Ascites Zellen der Maus nachzuweisen. Mit dem mausspezifischen Primer für mClCa1-3 konnten jedoch keine entsprechende Fragmente mittels PCR amplifiziert werden.

Kontrovers diskutiert wird außerdem die Möglichkeit, dass es sich bei

ClCas gar nicht um Ionenkanäle handelt, sondern vielmehr um regulierende Proteine, die Chloridkanäle beeinflussen. Mit dem Nachweis des ClCa-Typs hClCa3 kam zusätzlich die Idee auf, dass die ClCas Funktionen besitzen, die in keinem Zusammenhang mit Kanaleigenschaften stehen, da der hClCa3 nicht in der Lage ist, Ionen transmembranär zu transportieren. Weiterhin ist bekannt, dass der mClCa3 die Schleimproduktion im Intestinum und in der Lunge fördert (Übersicht siehe: Eggermont 2004).

Die funktionelle Bedeutung der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- Kanäle an respiratorischen Epithelien ist mittlerweile allgemein anerkannt (Anderson & Welsh 1991; Nilius *et al.* 1997). Ihre Relevanz an sekretorischen Epithelien des Intestinaltraktes hingegen wird immer noch verneint, obwohl zwischenzeitlich der Nachweis eines CaCCs am Kolon der Ratte gelang (Schultheiss *et al.* 2005). Dazu trägt zum einen bei, dass CFTR -/- Knockout-Mäuse weiterhin an schweren gastrointestinalen Störungen leiden. Zum anderen blieben Versuche, eine calciumaktivierte Chloridleitfähigkeit an humanem Gewebe aus Kolon und Rektum nachzuweisen, bislang erfolglos (Übersicht siehe: Kunzelmann & Mall 2002). Auch an isolierten Krypten aus dem Kolon von Ratten entwickelte sich eine entsprechende Leitfähigkeit nur nach Vorbehandlung mit Karzinogenen. An intakten Kolonepithelien unter Standardbedingungen war sie jedoch nicht messbar (Böhme *et al.* 1991), sondern ließ sich nur nachweisen, wenn die dominante Wirkung eines Anstiegs der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration auf K^+ -Kanäle unterdrückt wurde (Schultheiss *et al.* 2005).

3 Eigene Fragestellung

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, nehmen CaCCs in vielen Zelltypen eine wichtige Rolle im Chloridtransport ein. Besondere Bedeutung haben sie zum Beispiel im Epithel der Atemwege im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Cystischen Fibrose.

Die Existenz von CaCCs im Kolonepithel wurde lange kontrovers diskutiert. Durch den funktionellen Nachweis eines CaCC am Kolonepithel der Ratte (Schultheiss *et al.* 2005) kamen bezüglich der Bedeutung des CaCC für den Elektrolyttransport im Kolonepithel der Ratte folgende Fragen auf:

- Wie stark ist die Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration nach Aktivierung des CaCC?
- Ist die Antwort abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen ?
- Wie erfolgt die Signaltransduktion zur Aktivierung des CaCC ?

II Material und Methoden

1 Versuchstiere

Bei sämtlichen Versuchstieren handelte es sich um Wistar-Ratten des Instituts für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum mit einem 12-Stunden-hell-12-Stunden-dunkel-Regime gehalten. Futter und Wasser standen ständig ad libitum zur Verfügung.

Für die Imagingversuche wurden weibliche Ratten im Alter von fünf bis sechs Wochen und mit einem Gewicht von 120 bis 150 g verwendet. Die Ussingkammerversuche wurden mit Ratten mit einer Körpermasse von 150 bis 380 g durchgeführt (Schultheiss *et al.* 2002).

2 Verwendete Lösungen

2.1 Lösungen für die Kryptenisolation

2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung

Die Lösung (Parsons & Paterson 1965) enthielt in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: NaCl 107; KCl 4,5; NaHCO_3 25; Na_2HPO_4 0,2; CaCl_2 1,25; MgSO_4 1 und Glucose 12,2. Die Lösung wurde mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid; Vol/Vol) begast und das pH mit $\text{NaHCO}_3/\text{HCl}$ auf 7,4 titriert.

2.1.2 Isolationslösung

Die Isolationslösung für die Krypten bestand aus (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 107; KCl 4,5; NaHCO_3 25; Na_2HPO_4 1,8; NaH_2PO_4 0,2; Glucose 12,2; Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA) 10 und 1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ bovines Serumalbumin (BSA).

Der pH-Wert wurde unter Carbogenbegasung mittels Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und HCl auf 7,4 eingestellt. Um den Isolationsprozess zu beschleunigen und eine größere Zahl vollständig intakter Krypten zu erhalten, wurde die Temperatur dieser Lösung bei 40° C gehalten.

2.1.3 Auffang-Tyrode

Aufgefangen wurden die isolierten Krypten in einer kaliumreichen, chloridarmen Tyrode-Lösung (Böhme *et al.* 1991; Diener *et al.* 1991), im Folgenden Auffangtyrode genannt. Diese enthielt (in mmol·l⁻¹): Kaliumgluconat (KGluc) 100; KCl 30; N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure (HEPES) 10; NaCl 20; MgCl₂ 1; CaCl₂ 1,25; Glucose 12,2; Natriumpyruvat 5 sowie 1 g·l⁻¹ BSA. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mit KOH/HCl.

2.2 Lösungen für die Imagingversuche

2.2.1 DiH-MEQ-Lösung

Es wurde eine ca. 20 µmol·l⁻¹ Lösung von Di-Hydro-6-methoxy-N-ethylchinolin-jodid (DiH-MEQ) in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Zur Aufladung der Krypten mit dieser membrangängigen Vorstufe des halidsensitiven Farbstoffs MEQ (6-Methoxy-N-ethylchinolin Jodid) wurde davon eine 400 µmol·l⁻¹ Lösung in Auffang-Tyrode angesetzt.

2.2.2 NaCl-Lösung

Die Versuche wurden alle mit einer 140 mmol·l⁻¹ NaCl-Tyrode begonnen. Diese enthielt (in mmol·l⁻¹): NaCl 140; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 12,2; CaCl₂ 1,25; MgCl₂ 1. Der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

2.2.3 KCl-Lösung

Bei allen Versuchen wurde anschließend in eine $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl-Lösung gewechselt, um die Zellmembran zu depolarisieren. Diese Lösung enthielt (in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$): KCl 140; HEPES 10; Glucose 12,2; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1. Der pH-Wert wurde mit KOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

2.2.4 KGluc-Lösung

Um den Efflux der Chloridionen zu fördern, wurde daraufhin KCl äquimolar durch KGluc ersetzt. Die Lösung enthielt demnach (in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$): KGluc 140; HEPES 10; Glucose 12,2; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1. Der pH-Wert wurde mit KOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

2.2.5 Eichlösungen

Am Ende jedes Versuches wurde die Fluoreszenzintensität des halidsensitiven Farbstoffs MEQ kalibriert. Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

- **$140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluc-Lösung** mit $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tributylzinnchlorid (TBT; dieses Ionophor vermittelt einen Cl^- - OH^- -Austausch, siehe Kapitel 5.4) und $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Nigericin (diese Ionophore vermittelt einen K^+ - H^+ -Austausch, siehe Kapitel 5.4) zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz des MEQ.
- **$39 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl/KGluc-Mischlösung** bestehend aus der $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluc-Lösung und der oben genannten $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl-Lösung in einem Mischungsverhältnis von 3 : 1.
- **$140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KSCN-Lösung**. Enthalten waren (in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$): KSCN 140; HEPES 10; Glucose 12,2; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1. Der pH-Wert wurde mit KOH/HCl auf 7,4 eingestellt. Die Lösung enthielt $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Valinomycin (wirkt als K^+ -Ionophore, siehe Kapitel 5.4).

2.3 Lösungen für die Immunhistochemie

2.3.1 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung

5 g·l⁻¹ Gelatine (300 bloom, bloom = Indikator für die Festigkeit der erkalteten Form der Gelatine) wurden in Aqua dest. gelöst und erhitzt. Es folgte die Zugabe von 0,5 g·l⁻¹ Chromkaliumsulfat bei 54° C. Die Lösung wurde dann auf 61° C erhitzt.

2.3.2 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung

100 g·l⁻¹ Haushaltsgelatine wurde in Aqua dest. gelöst und auf 37° C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Filterung durch einen Papierfilter.

2.3.3 Phosphatpuffer (= PB)

Eine 0,2 mol·l⁻¹ NaH₂PO₄-Stammlösung und eine 0,2 mol·l⁻¹ Na₂HPO₄-Stammlösung wurden hergestellt. Davon wurde ein Volumenanteil NaH₂PO₄-Stammlösung mit vier Volumenanteilen Na₂HPO₄-Stammlösung gemischt. Um eine 0,1 mol·l⁻¹ Lösung zu erhalten, wurde diese Mischlösung mit fünf Volumenanteilen Aqua dest. aufgefüllt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mit NaOH/HCl.

2.3.4 Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung

Die Zusammensetzung dieses Puffers (= PBS, phosphate-buffered saline) bestand aus (in mmol·l⁻¹): NaCl 120; KCl 2,7; Phosphatpuffer 10. Mit NaOH/HCl wurde der pH auf 7,4 eingestellt.

2.3.5 Blockinglösung

In dem oben genannten $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurden $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ BSA, $100 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ normales Ziegenserum (normal goat serum = NGS), sowie $5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ Triton-X-100 gelöst.

2.3.6 Primärantikörperlösung

In dem $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurden $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ BSA, $10 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ NGS, $5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ Triton-X-100 und $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Magermilchpulver gelöst.

2.3.7 Sekundärantikörperlösung

In dem $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurden $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ BSA, $5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ Triton-X-100 und $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Magermilchpulver gelöst.

2.3.8 DAPI (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat)-Lösung

Zur Markierung von Zellkernen wurde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat) eingesetzt. 10 mg DAPI gelöst in 2 ml Aqua dest. ergaben eine $10,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Stammlösung. Davon wurde die $300 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gebrauchslösung hergestellt, indem $6,8 \text{ } \mu\text{l}$ DAPI-Stammlösung mit 250 ml PBS gemischt wurden.

2.4 Lösungen für die Ussingkammer-Messungen

Zu Beginn der Versuche befand sich sowohl auf der mukosalen als auch auf der serosalen Gewebeseite die bereits unter Punkt 2.1.1 beschriebene HCO_3^- -gepufferte Parsons-Lösung. Alle folgenden Lösungen wurden mit KOH und HCl unter Carbogenbegasung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.4.1 KCl-Lösung

Nachfolgend wurde auf der serosalen Seite dieser Parsons-Puffer durch eine kaliumreiche $111.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl Parsons-Lösung ersetzt und somit die basolaterale Membran depolarisiert. Sie beinhaltete (in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$): KCl 111,5; NaHCO_3 25; Na_2HPO_4 1,8; NaH_2PO_4 0,2; Glucose 12,2; Calciumgluconat 5,75 und MgSO_4 1,0.

2.4.2 KGluc-Lösung

Schließlich folgte mucosal der Wechsel in eine $107 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluc-Lösung, wodurch ein Chlorid-Gradient von mucosal nach serosal angelegt wurde. Die $107 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluc-Lösung enthielt (in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$): KGluc 107; NaHCO_3 25; Na_2HPO_4 1,8; NaH_2PO_4 0,2; KCl, 4,5; Glucose 12,2; Calciumgluconat 5,75; und MgSO_4 1,0.

3 Substanzen

Alle eingesetzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Sigma, Taufkirchen, Deutschland, bezogen. Von anderen Herstellern stammten folgende Chemikalien:

BSA Fraktion V (lyophil)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Citifluor	Plano, Wetzlar, Deutschland
Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glibenclamid (1-{4-[2-(5-Chlor-2-methoxy-benzamido-)-ethyl]-phenyl-sulfonyl}-3-cyclohexyl-harnstoff)	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Gö 6983 (2-[1-(3-dimethylpropyl)-5-methoxy-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimid)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Haushaltsgelatine	RUF, Quakenbrück, Deutschland
Jasplakinolide	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-NAME (Nitro-L-Arginin Methylester)	Tokris Cookson, Bristol, England
Magermilchpulver	Sucofin, TSI GmbH&Co, Zeven, Deutschland
MEQ (6-methoxy-N-ethylchinolinin Chlorid)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nitroprussid	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Normal Goat Serum	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
OAG	Calbiochem, Bad Soden,

(Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol)	Deutschland
Poly-L-Lysin (Molekulargewicht:> 300 kD)	Biochrom, Berlin, Deutschland
SITS (4-Acetamido-4'-isothiocyanato- stilben-2,2'-disulfonsäure Natriumsalz)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Tissue Tec	O.C.T. Compound, Miles, Elkhart, USA
U-73122 (1-[6(17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien- 17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrol-2,5-dion)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

4 Die Gewebepräparation

4.1 Die Präparation der Darmschleimhaut

Die Ratten wurden mittels Genickschlag betäubt und anschließend durch Entbluten getötet (Tötung der Tiere zur Organentnahme genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Die Eröffnung des Abdomens erfolgte entlang der Linea alba, zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens erleichterten den Zugang zur Bauchhöhle. Das Kolon wurde an seinem distalen Ende proximal des Lymphknotens, der den Übergang zum Rektum markiert (Lindström *et al.* 1979), mit einer Schere abgesetzt. Nach stumpfer Präparation zur Ablösung vom Mesenterium wurde das Kolon proximal am Übergang zum Caecum abgeschnitten und sofort in eisgekühlte, Carbogen-begaste Parsons-Lösung (Parsons & Paterson 1965) gelegt.

Das Darmlumen wurde mit der eisgekühlten Parsons-Lösung gespült und gereinigt. Daraufhin wurde der Darmschlauch auf einen dünnen Kunststoffstab mit einem Durchmesser von 5 mm gezogen. Zur Isolation von Krypten wurden anschließend Tunica serosa und Tunica muscularis stumpf von distal nach proximal abpräpariert, um ein Mukosa-Submukosa-Präparat zu erhalten. Dieser Vorgang wird im folgenden als Strippen bezeichnet. Es lagen danach nur noch folgende Zellschichten von serosal nach mukosal vor: Lamina muscularis mucosae, Lamina propriae mucosae und Lamina epithelialis.

Für die Ussingkammer-Versuche wurden von distal ausgehend zwei ca. 3 cm lange Stücke ungestrippten Kolons abgetrennt und im Mesenterialansatz in Längsrichtung aufgeschnitten.

4.2 Die Präparation isolierter Krypten

Die Krypten wurden nur aus dem distalen Bereich des Kolons isoliert. Dieser ist leicht daran zu erkennen, dass er keine Querstreifung der Schleimhaut aufweist, wie dies im proximalen Kolon der Fall ist (Lindström *et al.* 1979). Zuerst wurde das Gewebe wie in Kapitel II.4.1 beschrieben präpariert. Zur Isolierung der Krypten wurde dann von dem Mukosa-Submukosa-Präparat ein etwa 1,5 auf 3 cm großes Stück mittels Cyanacrylatkleber auf einen mit einer ovalen Aussparung versehenen Plexiglashalter fixiert (Schultheiss *et al.* 2002). Je nach Alter und Gewicht der Tiere erfolgte nun die sechs- bis acht-minütige Inkubation des Gewebes in einer Ca^{2+} -freien EDTA-haltigen Isolationslösung bei 40° C unter Carbogenbegasung. Anschließend wurde der Plexiglashalter in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) gespannt; durch die entstehende Vibration wurden die Krypten in die Auffangtyrode geschüttelt. Mit Hilfe einer Mikropipette wurden 30 μl der Kryptensuspension unter optischer Kontrolle entnommen und auf runde, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen aufgebracht. Die 30 μl Kryptensuspension wurde mit Auffangtyrode auf 100 μl aufgefüllt.



Abb. II.1: Einzelne Krypte, isoliert aus dem Kolon einer Ratte.

5 Die Imaging-Technik

5.1 Der halogenidsensitive Farbstoff MEQ

Änderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen lassen sich mittels Fluoreszenzfarbstoffen, die für das jeweilige Ion spezifisch sind, messen.

Als Indikatoren für Chlorid wurden verschiedenste Chinoline untersucht. Alle Farbstoffe dieser Gruppe verfügen über ein positives, am Chinolin gebundenes Stickstoffatom, welches essentiell für die Bindung der Halogenide ist, jedoch die Passage durch die Zellwand verhindert. Typisch ist außerdem, dass ihre Fluoreszenz durch Kollision mit Halogeniden abgeschwächt („gequencht“) wird (Chao *et al.* 1989; Biwersi & Verkman 1991).

Bisher fanden aus der Gruppe der Chinoline vor allem die Indikatorfarbstoffe SPQ (6-Methoxy-N-(3-sulfopropyl)chinolin) und MQAE (6-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxychinolin Bromid) Einsatz. Um Zellen mit diesen Farbstoffen aufzuladen, wurden invasive Verfahren verwendet, wie zum Beispiel die Mikroinjektion oder der hypoosmolare Schock. Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass sie Artefakte durch Zellschädigungen provozieren. Auch ist es schwierig, auf diese Weise kleine Zellen oder Zellen im Zellverband aufzuladen.

1991 stellten Biwersi und Verkman einen neuen Chlorid-sensitiven Farbstoff vor, das MEQ (6-Methoxy-N-ethylchinolin Chlorid, Abb. II.2). MEQ besitzt in etwa die gleichen Fluoreszenzeigenschaften wie SPQ und MQAE. Entscheidender Vorteil ist jedoch die Möglichkeit, eine unpolare Form, DiH-MEQ, synthetisieren zu können, die passiv durch die Zellmembran diffundieren kann. DiH-MEQ selbst ist nicht Chlorid-sensitiv, wird aber intrazellulär schnell reoxidiert und somit wieder in die positiv geladene Form, MEQ, umgewandelt.

In Versuchsreihen ermittelten Biwersi und Verkman Umsetzungsrate von 0,9 %·min⁻¹ in zellfreiem Medium bei Raumluft und von 2,0 % min⁻¹ nach Zugabe eines Muskelzell-Homogenats. Die effektivere Umsetzung von DiH-MEQ zu MEQ in Zellen erklärt sich im Vorhandensein verschiedenster oxidativer Enzyme, wie zum Beispiel NADP⁺-abhängige Dehydrogenasen, sowie oxidierender metabolischer Substrate in lysosomalen, peroxisomalen und cytosolischen Kompartimenten. Im Cytoplasma angereichert und zu MEQ reoxidiert, ist der Farbstoff aufgrund seiner positiven Ladung nicht mehr in der Lage, wieder aus der Zelle heraus zu diffundieren.

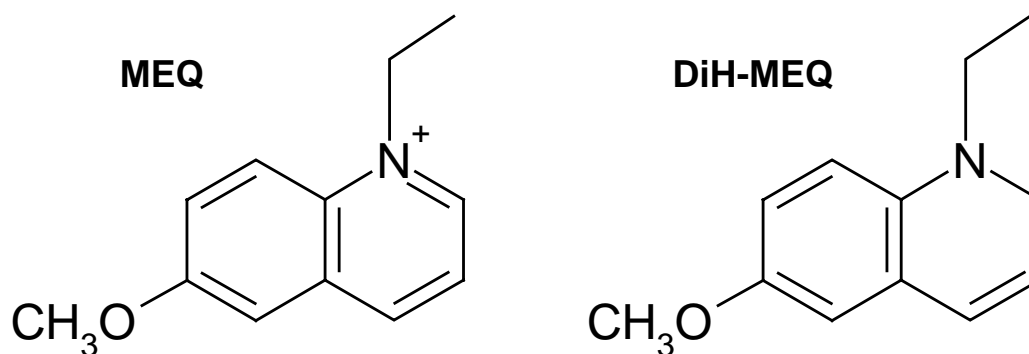


Abb. II.2: Strukturformel von MEQ und DiH-MEQ.

MEQ ist sensibel für alle Halogenide (wie z.B. Cl⁻, Br⁻ und I⁻), sowie für Thiocyanat (SCN⁻). Sein Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 344 nm (Biwersi & Verkman 1991). Trifft ein Halogenid auf ein MEQ-Molekül, kommt es zu dem bereits erwähnten Kollisions-Quench. Das Halogenid fungiert als Löschmolekül und quencht die Fluoreszenz mit einer jeweils typischen Stern-Volmer-Konstante (K):

$$K_{\text{Br}} = 275 \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}; K_{\text{I}} = 360 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}; K_{\text{SCN},} = 300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Die Fluoreszenzintensität verhält sich somit umgekehrt proportional zur Halogenidkonzentration. Messungen zeigten, dass die Fluoreszenzintensität innerhalb von weniger als 1 ms auf Änderungen der Ionenkonzentration reagiert (Biwersi & Verkman 1991).

5.2 Herstellung von DiH-MEQ aus MEQ

Wie bereits erwähnt, kann das MEQ-Molekül aufgrund seines positiv geladenen Stickstoffatoms die Zellmembran nicht permeieren. Daher musste zur Aufladung der Krypten eine Farbstofflösung mit der reduzierten Form, dem DiH-MEQ, hergestellt werden, um die Membranpassage zu ermöglichen. Da DiH-MEQ nur kurzzeitig aufbewahrt werden kann (maximal 14 Tage bei -70°C), wurde der Farbstoff jeweils frisch aufgearbeitet.

Hierzu wurden 5 mg MEQ unter Lichtschutz in 100 μl Aqua dest. gelöst und für eine Minute mit gasförmigen Stickstoff (N_2) überspült. Zwischenzeitlich wurden 50 μl einer 12%-igen (Gew/Vol) Lösung aus Natrium-Borohydrid (NaBH_4) und Aqua dest. hergestellt. Das Natrium-Borohydrid diente zur Reduzierung des MEQ zu DiH-MEQ. Dazu wurden 10 μl (32 μmol) der 12 %igen NaBH_4 -Lösung zu dem gelösten MEQ pipettiert und für 30 min inkubiert. Um daraufhin das so synthetisierte DiH-MEQ aus der Reduktionslösung zu extrahieren, wurde dem Reaktionsansatz 0,5 ml Chloroform (CHCl_3) als Lösungsmittel und 0,5 ml Aqua dest. zugefügt und die Lösung anschließend für 30 s mit dem Vortex gemischt. Das DiH-MEQ löste sich dabei in dem Chloroform, während das hydrophile NaBH_4 in wässriger Lösung verblieb. Nachdem sich die Schichten aufgetrennt hatten, wurde das DiH-MEQ enthaltende Chloroform in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. Daraufhin wurde der Extraktionsvorgang mit der verbliebenen wässrigen Lösung ein zweites Mal durchgeführt, um die vollständige Menge an

synthetisierten DiH-MEQ zu gewinnen.

Nach der Extraktion wurde mit Hilfe von 100 mg Natriumsulfat (NaSO_4 , wasserfrei) dem Chloroform-DiH-MEQ-Gemisch das restliche Wasser entzogen. Durch Erwärmung des Gemisches in einem Wärmeblock auf 50 °C verflüchtigte sich schließlich das Chloroform und nur der reduzierte Farbstoff blieb im Reaktionsgefäß zurück. Dieser wurde dann in 625 µl DMSO gelöst. Die Lösung wurde portioniert und bei -70° C aufbewahrt. Sämtliche Syntheseschritte sowie das Aliquotieren des fertigen Farbstoffes fanden unter Stickstoff-Atmosphäre statt, um die Reoxidation des DiH-MEQ zu MEQ zu verhindern.

5.3 Kalibrierung der Fluoreszenz per Doppel-Ionophor-Technik

Bei den Fluoreszenz-Indikator-Farbstoffen werden die „Wavelength shifting dyes“ von den „Wavelength stable dyes“ unterschieden. Ein typischer Vertreter der ersten Gruppe ist Fura-2, ein Ca^{2+} -sensitiver Farbstoff. Mit Bindung des Zielions ändern die „Wavelength shifting dyes“ ihr Exzitationsmaximum. Diese Eigenschaft erleichtert die Unterscheidung des gebundenen vom ungebundenen Farbstoff und wird bei der so genannten Verhältnis (Ratio)-Messung genutzt.

MEQ hingegen zählt zu den „Wavelength stable dyes“. Typisch für diese Farbstoffgruppe ist, dass sich ihr Exzitations- und Emissionsmaximum durch Bindung des Zielions nicht ändert (Abb. II.3).

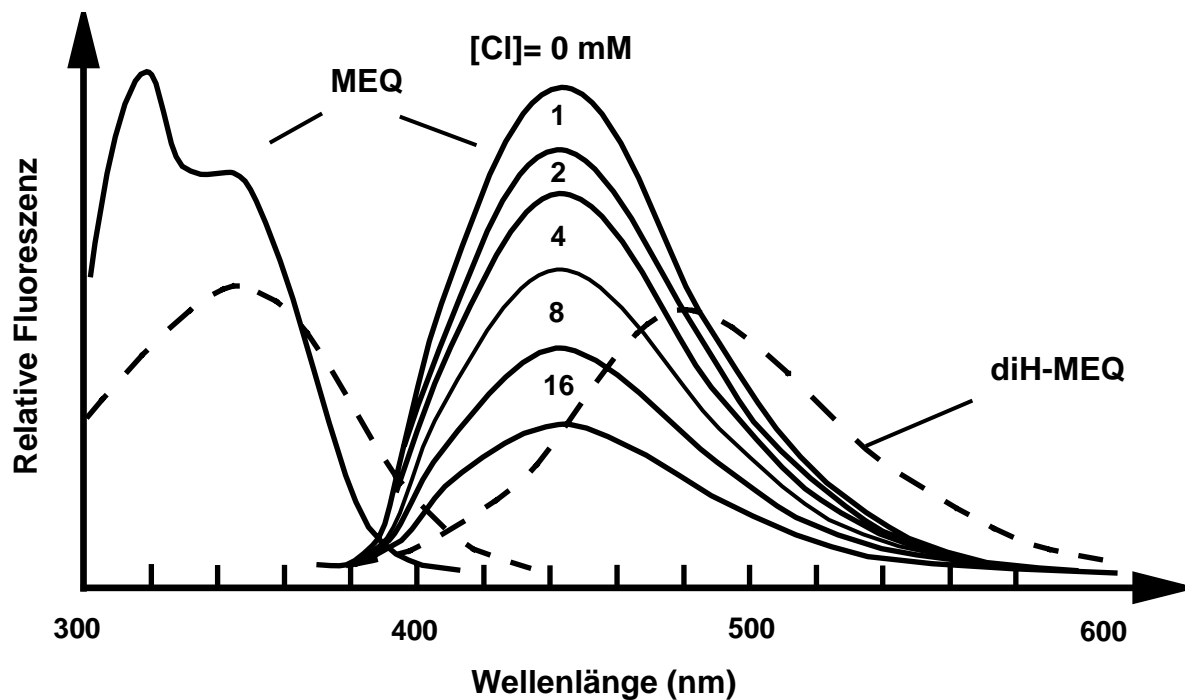


Abb. II.3: Fluoreszenzeigenschaften von MEQ (durchgehende Linien) und DiH-MEQ (gestrichelte Linie, modifiziert nach Biwersi & Verkman 1991).

Exzitations (links)- und Emissionsspektren (rechts) in $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumphosphat-Lösung, pH 7,4 bei verschiedenen Cl^- -Konzentrationen (0, 1, 2, 4, 8 und $16 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

Um von der Intensität der MEQ-Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Konzentration des vorhandenen Halogenids machen zu können, muss daher am Ende eines jeden Versuches eine Kalibrierung durchgeführt werden. Hierfür wurde die so genannte Doppel-Ionophoren-Technik angewendet.

Dazu wird mittels Hochkalium-Lösungen die Depolarisation der Zellmembran herbeigeführt. Die zur Kalibrierung eingesetzten Lösungen besitzen unterschiedliche Halogenidkonzentrationen. So kann die Fluoreszenzintensität bei hoher und bei mittlerer Konzentration des Halogenids, sowie in dessen Abwesenheit ermittelt werden. Zusätzlich werden Ionophoren eingesetzt, um die Permeabilität der Membran zu erhöhen, so dass die intrazelluläre Halogenidkonzentration der extrazellulär angebotenen entspricht.

Bei den von mir durchgeführten Versuchen wurden die in Kapitel II.2.2 beschriebenen Lösungen eingesetzt. Mit der annähernd chloridfreien 140 mmol·l⁻¹ KGluc-Lösung wurde die höchste Fluoreszenzrate und mit der KGluc/KCl Mischlösung (39 mmol·l⁻¹ KCl) eine mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt. Zum Erreichen eines vollständigen Quenches wurde eine 140 mmol·l⁻¹ KSCN-Lösung verwendet. SCN⁻ gelangt durch Chloridkanäle in das Zellinnere (Harris 1958; Hagiwara & Takahashi 1974; Bormann *et al.* 1987; Vaughan 1987; Halm & Frizzell 1992; Linsdell 2001) und führt dort zu einer negativen Aufladung. Um dem entgegenzuwirken und einen Ladungsausgleich zu erreichen, wurde der Lösung Valinomycin als K⁺-Ionophore zugegeben.

Mittels der auf diesem Weg erhaltenen Eichkurve konnte für jede gemessene Zelle die Rate der Fluoreszenzänderung entsprechend der jeweiligen Chloridkonzentration ermittelt werden. Mit der folgenden Formel konnten daraufhin die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration ([Cl⁻]_i) berechnet werden (MacVinish *et al.* 1993):

$$F_0/F = 1 + K_{Cl} * [Cl^-]$$

F₀ = Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Cl⁻

F = Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von Cl⁻

K_{Cl} = Stern-Volmer-Konstante von Cl⁻

[Cl⁻] = Cl⁻-Konzentration

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften, und vor allem wegen des schonenden Aufladeprotokolls, fiel die Wahl für die durchgeführten Imaging-Versuche auf MEQ.

5.4 Die Ionophoren

5.4.1 Tributylzinn-Chlorid (TBT)

Die zinnorganische Verbindung TBT, laut WHO (World Health Organization) einer der giftigsten anthropogen hergestellten Stoffe, findet Einsatz als Stabilisator in Kunststoffen und als Biozid in Holzschutzfarben. Besondere Bedeutung erlangte es in der Schiffsindustrie. Hier wird es in Antifoulingfarbe für Schiffsanstriche verwendet um einen Bewuchs mit Seepocken, Algen oder Muscheln zu verhindern (Boyer 1989; Fent *et al.* 1998). In den letzten Jahren wurden umfangreiche Studien zur Wirkweise von TBT durchgeführt. Dabei konnte unter anderem die Cytotoxizität von TBT für Thymocyten und das Knochenmark nachgewiesen werden (Snoeijs *et al.* 1986), die, wie in einer späteren Studie festgestellt wurde, auf der Modifikation des Cytoskeletts durch Zerstörung des F-Actins beruht (Chow & Orrenius 1994). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass TBT als Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung fungiert. Es kommt zu Membranschäden, Störung des Energie-Metabolismus und zur Hemmung der AMP-Synthese (Snoeijs *et al.* 1986). Eine Studie an HL-60-Zellen zeigte eine dosisabhängige Induktion von Apoptose und Nekrose durch TBT (Zaucke *et al.* 1998).

Einsatz als Ionophor findet TBT aufgrund seiner über Komplexbildung vermittelten Funktion als Cl^-/OH^- -Austauscher. Hierbei erfolgt eine 1 : 1 Bindung von Cl^- an die Zinnkomponente des TBT-Moleküls (Tosteson & Wieth 1979).

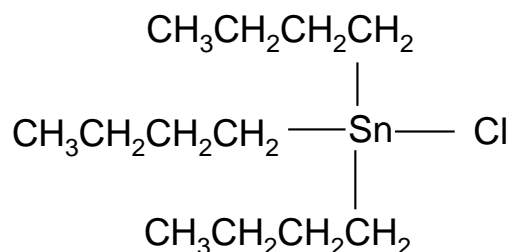


Abb. II.4: Tributylzinn-Chlorid (TBT).

5.4.2 Nigericin

Nigericin gehört zur Gruppe der carboxylischen Ionophoren und fungiert als K^+/H^+ -Austauscher. Auch hier erfolgt eine Komplexbildung mit dem Ion. Dies ist jedoch nur in der deprotonierten Form von Nigericin möglich. Als protoniertes Ionophor diffundiert Nigericin an die Membranoberfläche und gibt dort sein Proton ab. Wird ein passendes Ion angetroffen, ersetzen Sauerstoffatome des Nigericins dessen Hydrathülle und das Ion wird vom Ionophor vollkommen umschlossen.

Das so entstandene neutrale Zwitterion diffundiert durch die Membran zur gegenüberliegenden Membranoberfläche. Dort wird das Ion wieder abgegeben und erneut von einer Hydrathülle umschlossen. Das protonierte Nigericin diffundiert zurück in die Membran. Folglich handelt es sich hierbei um eine neutrale Transportform, die keinem Einfluss elektrischer Potenziale unterliegt, jedoch pH-sensitiv ist (Pressman 1976).

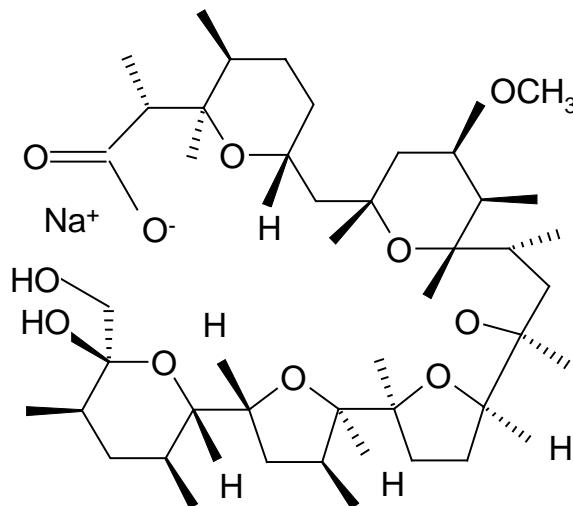


Abb. II.5: Nigericin.

5.4.3 Valinomycin

Valinomycin gehört zu den neutralen Ionophoren. Seine Funktionsweise ist der des Nigericins ähnlich. Valinomycin diffundiert an die Membranoberfläche und trifft dort auf ein passendes Ion. Dessen Hydrathülle wird abgestreift und durch Sauerstoffatome des Valinomycins ersetzt. Es entsteht ein stabiler Komplex aus positiv geladenem Ion und neutralem Ionophor. Der Komplex diffundiert zur gegenüberliegenden Membranoberfläche. Dort bindet das Ion von neuem Wassermoleküle und löst sich aus dem Komplex (Pressman 1976).

Typisch für Valinomycin ist seine extreme Ionenselektivität. Wie Untersuchungen mit der Röntgen-Kristallographie (Pinkerton *et al.* 1969) und kernmagnetischer Resonanz (NMR) (Ivanov *et al.* 1969) ergaben, ist dieses Phänomen in der Konformation begründet, die das Molekül zur Komplexbildung annimmt.

Valinomycin stellt sich als Reif mit einer Höhe von 4 Å und einem Durchmesser von 8 Å dar. Der plane Reif wird durch die molekulare Grundstruktur auf und ab gewunden und durch intramolekulare Hydrogenbindungen stabilisiert. Dadurch sind drei Ester-Carbonyle an der Oberfläche zentral fokussiert und drei weitere am Boden des Moleküls. Der so entstandene starre Bereich ist in der Lage Ionen der Dimension von K^+ ($r = 1.33 \text{ Å}$) bequem zu binden. Auch größere Ionen wie Rb^+ ($r = 1.45 \text{ Å}$) und Cs^+ ($r = 1.69 \text{ Å}$) können aufgenommen werden. Das Gerüst ist jedoch zu starr, um kleinere Ionen wie zum Beispiel Na^+ ($r = 0.95 \text{ Å}$) oder Li^+ ($r = 0.60 \text{ Å}$) richtig zu fokussieren. Dies zeigt, dass die freie Energie zur Komplexbildung von der Zahl der Carbonyl-Sauerstoffatome, die kontaktiert werden können, abhängig ist. Jegliche Veränderung des Potentials auf beiden Seiten der Membran beeinflussen hierbei den diffusionalen Transport elektrophoretisch. Das Gleichgewicht wird somit sowohl durch den chemischen als auch durch den elektrischen Gradienten definiert und folgt der Nernst'schen Gleichung.

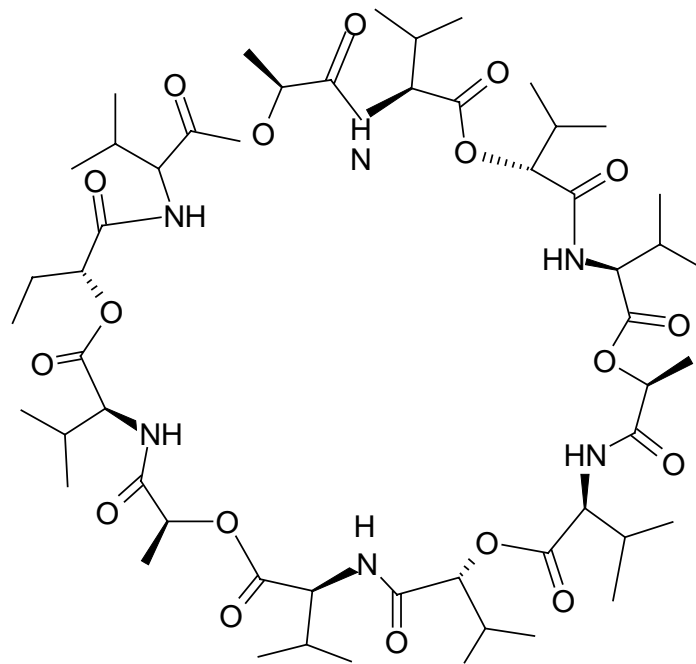


Abb. II.6: Valinomycin.

5.5 Der Imagingstand

5.5.1 Mikroskop und elektrische Komponenten

Alle Imaging-Versuche wurden an einem inversen Lichtmikroskop der Firma Olympus durchgeführt (Olympus IX-50, Olympus Optical, Tokyo, Japan). Zur Ausstattung des Mikroskops gehört ein Epifluoreszenz-Setup und ein Imagingssystem (Till Photonics, Gräfeling, Deutschland).

Die Monochromatoreinheit, die zur Anregung des Farbstoffes MEQ nötig ist, wird über ein Software-Protokoll gesteuert. Als Lichtquelle dient eine in die Einheit integrierte Xenonlampe. Die gewünschten Wellenlängen werden mit Hilfe von Spiegeln, Linsen und einem Beugungsraster erzeugt und anschließend über ein Lichtleiterkabel und einen Epifluoreszenz-Kondensor zum Mikroskop weitergeleitet.

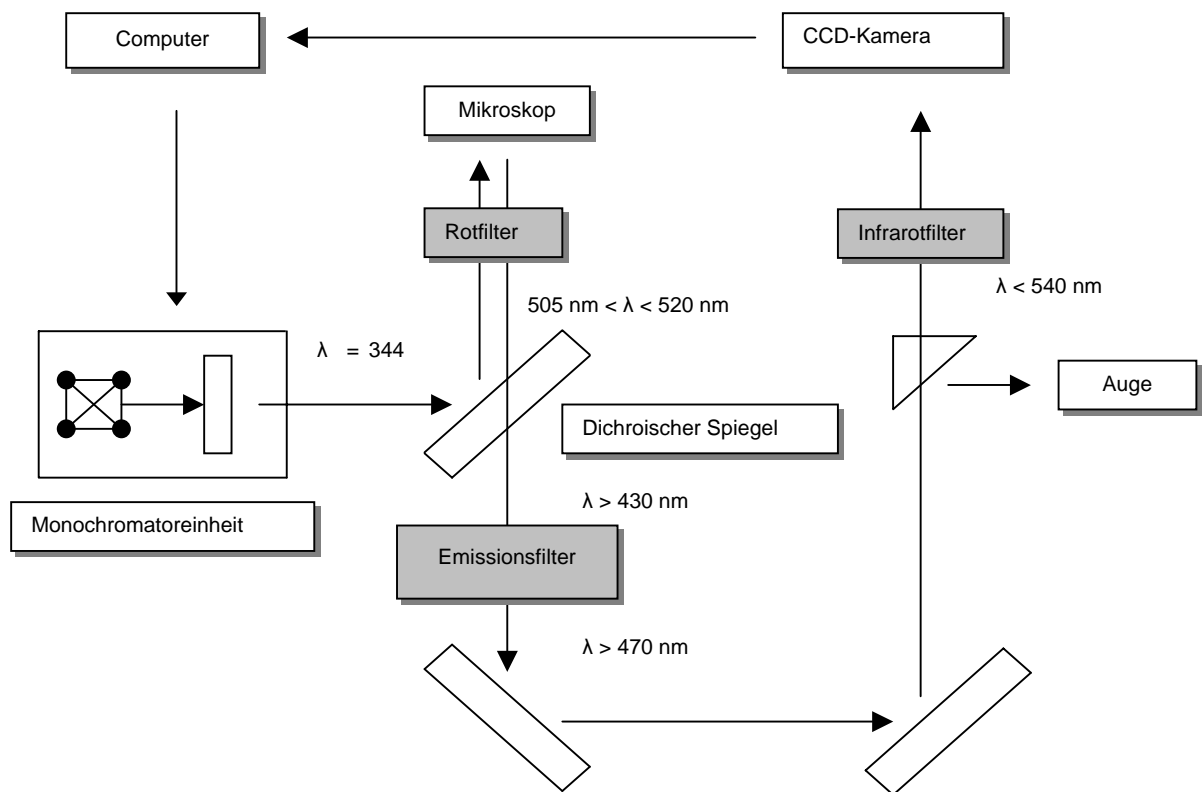


Abb. II.7: Schematische Darstellung des Imaging-Setups.

Dort wird das ankommende Anregungslicht über einen dichroischen Spiegel durch das Objektiv zu den Zellen reflektiert. Die Zellen emittieren längerwelliges Licht (505 - 520 nm). Dieses durchdringt den dichroischen Spiegel und einen Emissionsfilter der CCD (charge-coupled device)-Kamera (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland), die das Lichtsignal erfasst. Daraufhin wird das entstandene Bild von der CCD-Kamera an den Computer übermittelt.

5.5.2 Messkammern und Perfusionssystem

30 μl der isolierte Krypten enthaltenden Lösung wurden mit einer Eppendorfpipette aufgesammelt und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen übertragen. Kleine Zellkulturschalen von 4 cm Durchmesser dienten als Messkammern. Zentral wurde ein 10 mm großes Loch in die Kammern gebohrt. Unter diese Aussparung wurden die Glasplättchen mit

hochvisköser Silikonpaste (Baysilone[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland) befestigt.

Bei den ersten Versuchen wurde ein Perfusionsystem verwendet, das aus regulären Infusionsbestecken bestand, die über eine großlumige abgeschliffene Kanüle an einem Verteiler montiert war. Damit konnte das Präparat kontinuierlich mit einer Rate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ überspült werden. Eine, dem Verteiler gegenüber angebrachte Absaugungsvorrichtung sorgte für ein gleichbleibendes Flüssigkeitsvolumen von 3 ml und verhinderte ein Überlaufen der Kammer. Zusätzlich waren 3 Spritzen à 10 ml an den Verteiler angeschlossen. Darin befanden sich die Eichlösungen, die manuell in die Kammer eingegeben wurden. Auch hier sorgte die Absaugungsvorrichtung für einen gleichbleibenden Flüssigkeitsspiegel. Sobald die Spritzen entleert waren, wurde das Absaugen gestoppt.

Bei einzelnen Versuchsprotokollen wurde ein Teil der Infusionsschläuche durch Spritzen ersetzt. So konnte zum Beispiel beim Einsatz von Substanzen wie SITS, DIDS, OAG oder auch Ionomycin das benötigte Flüssigkeitsvolumen minimiert werden.

Bei den anschließenden Versuchen zu Stickstoffmonoxid und dem Cytoskelett erfolgte der Flüssigkeitszu- und -ablauf ausschließlich über eine Schlauchpumpe der Firma Ole Dich Instrumentmakers APS (Hivdovre, Dänemark, Typ 11 OSC.G18.CH5B). Die Geschwindigkeit wurde so eingestellt, dass ein konstanter Flüssigkeitsaustausch von $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ stattfand.

5.6 Die Imaging-Experimente

5.6.1 Aufladung der Krypten

Als Grundlage zur Erstellung des Aufladeprotokolls diente das von Molecular Probes empfohlene Protokoll nach Biwersi und Verkman (Biwersi & Verkman 1991). Jedoch hat sich eine längere Aufladezeit von 15 anstatt 10 min bewährt. Verwendet wurde die unter Kapitel II.2.2.1 bereits beschriebene Farbstofflösung.

Vor der Aufladung wurden die auf den Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen befindlichen Krypten in den oben erwähnten Inkubationskammern in 100 μl Auffangtyrode aufbewahrt. Zur Aufladung wurde eine 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Lösung aus der bereits beschriebenen DiH-MEQ-Lösung (siehe Kapitel II.2.2.1) in der Auffangtyrode angesetzt. Pro Inkubationskammer wurden davon 400 μl zupipettiert und die Krypten für 15 min bei 37° C inkubiert. Anschließend folgte eine zweimalige Waschung der Krypten mit jeweils 500 μl Auffangtyrode pro Deckgläschen, gefolgt von einer zweiten Inkubationszeit von wiederum 15 min bei 37° C. Die zweite Inkubation ist wichtig, um den Zellen ausreichend Zeit zur Reoxidation des DiH-MEQ zu MEQ zu geben. Wie bereits erwähnt ist nur die oxidierte Form chloridsensitiv. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes fand der gesamte Aufladungsprozess unter Lichtausschluss statt. Die Aufbewahrung der aufgeladenen Krypten erfolgte ebenfalls lichtgeschützt.

5.6.2 Versuchsdurchführung

Bei 40-facher Vergrößerung wurde überwiegend der Fundus einer intakten Krypte im Sichtfeld des Mikroskops justiert. Wurde das Perfusionssystem verwendet, so waren der Perfusionsverteiler und der Absauger mittels Magneten am Objektisch befestigt. Kam die Schlauchpumpe zum Einsatz, so wurden Zu- und Ablaufschläuche über Teflonhalter am Objektisch fixiert.

Nach Umleiten des Strahlenganges des Mikroskops auf die CCD-Kamera konnte mit Hilfe der Imaging-Software „TILLvisION“ ein „Schnappschuss“ (*Snapshot*) des betreffenden Kryptenfundus erstellt werden.

Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden sowohl in Zahlenwerte als auch in falschfarbene Bilder umgesetzt. Die Falschfarbenskala reichte von dunkelblau bis rot. Nicht oder nur schwach fluoreszierende Bereiche wurden dunkelblau dargestellt, stark fluoreszierende Bereiche rot.

An dem so vorbereiteten Kryptenfundus wurden die zu messenden Regionen als ROIs (regions of interest) markiert. Im Verlauf des Experimentes wurden hier die Änderungen der intrazellulären Chloridkonzentration ermittelt. Zu Beginn jeden Experimentes erfolgte eine Superfusion des Präparates mit der bereits erwähnten $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl-Lösung (siehe Kapitel II.2.2.2). Erst nachdem sich in diesem annähernd physiologischen Milieu eine stabile Grundlinie (Baseline) eingestellt hatte, wurde der Wechsel in die $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl-Lösung (siehe Kapitel II.2.2.3) durchgeführt und damit die Depolarisation der Zellmembran erreicht. Die Applikation des stabilen Acetylcholin-Analogons Carbachol erfolgte grundsätzlich nach dem Erreichen der Baseline. Alle weiteren Lösungswechsel erfolgten ebenfalls erst nach Stabilisierung der Kurve in der jeweils vorausgehenden Lösung. Um den Ausstrom von Cl^- zu erleichtern, wurde anschließend durch den Wechsel in die $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluc-Lösung (siehe Kapitel II.2.2.3) ein Cl^- -Gradient angelegt. Nach Beendigung des Versuches folgte die Eichung für jede einzelne Krypte (siehe Kapitel II.5.3).

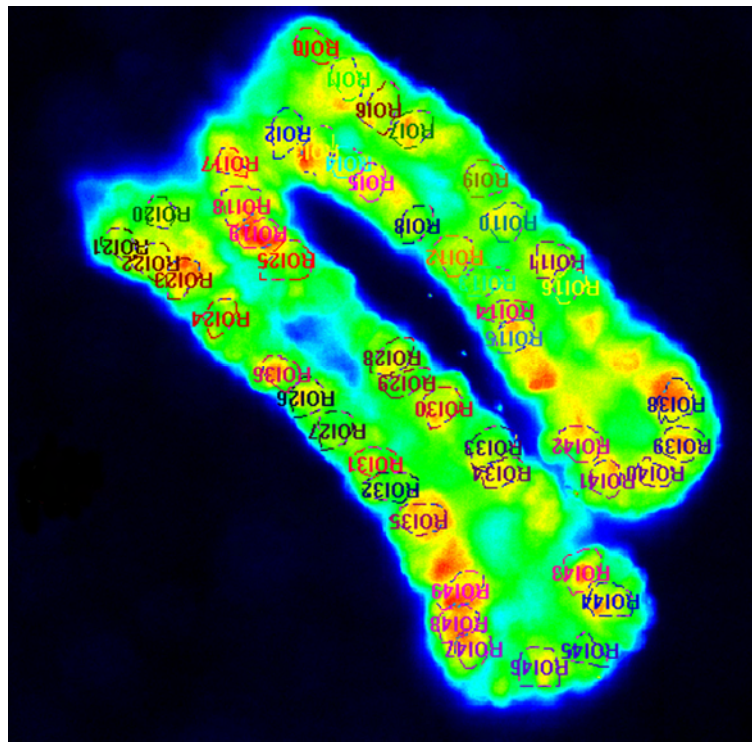


Abb. II.8: Falschfarbendarstellung zweier Krypten nach Aufladung mit MEQ.

Die Oberfläche ist jeweils links oben abgebildet, der Fundus rechts unten; Anregungswellenlänge 344 nm.

5.6.3 Stimulantien

Die folgende Tabelle II.1 stellt die eingesetzten Stimulantien dar:

Agonist	Wirkung	Konzentration (mol·l ⁻¹)
Carbachol	Muscarin- und Nicotinagonist; Aktivator der IP ₃ -vermittelten Ca ²⁺ - Signalwegs (Bleich <i>et al.</i> 1996)	5·10 ⁻⁵
Ionomycin	Ca ²⁺ -Ionophore aus <i>Streptomyces</i> <i>conglobatus</i> (Pressman 1976)	10 ⁻⁷
Oleoyl- acetyl-glycerol (OAG)	Aktivator von Proteinkinasen C (Kaibuchi <i>et al.</i> 1983; Kreutter <i>et al.</i> 1985)	1,5·10 ⁻⁴
Nitroprussid	NO-Donor (Wilson <i>et al.</i> 1993)	10 ⁻⁴

Tab. II.1: Wirkungsweise und Konzentrationen der eingesetzten Stimulantien.

5.6.4 Inhibitoren

Nachfolgend sind die verwendeten Inhibitoren tabellarisch zusammengefasst:

Inhibitor	Wirkung	Konzentration (mol·l ⁻¹)
Calmidazolium	Calmodulinantagonist (Gietzen <i>et al.</i> 1982; Fischer <i>et al.</i> 1987)	10 ⁻⁶
U-73122	Phospholipase C (PLC)-Blocker (Taylor & Broad 1998)	10 ⁻⁵
Staurosporin	Inhibitor der Proteinkinase C (+A) Antibiotikum aus <i>Streptomyces</i> sp. (Tamaoki <i>et al.</i> 1986)	10 ⁻⁶
Gö 6983	Proteinkinase C-Inhibitor (Wilkinson & Hallam 1994)	10 ⁻⁵
L-NNA	Inhibitor von NO-Synthasen (Reif & McCreedy 1995)	10 ⁻⁴
L-NMMA	Inhibitor von NO-Synthasen (Reif & McCreedy 1995)	10 ⁻⁴
Nocodazol	Depolymerisation von Mikrotubuli (Jordan <i>et al.</i> 1992)	3,5·10 ⁻⁶
Colchicin	Alkaloid aus der Herbstzeitlosen; depolymerisiert Mikrotubuli durch Bindung von Tubulindimere aus α - und β -Tubulin (Margolis & Wilson 1977; Andreu <i>et al.</i> 1998)	2,5·10 ⁻⁵
Jasplakinolide	Förderer der Actinpolymerisation durch Stabilisierung von F-Actin aus <i>Jaspis johnstoni</i> (Bubb <i>et al.</i> 1994; Bubb <i>et al.</i> 2000)	10 ⁻⁶
Cytochalasin D	Hemmung der Verlängerung des F- Actins am wachsenden Ende und dadurch Hemmung der Actin- Polymerisation (Lin <i>et al.</i> 1980)	10 ⁻⁵

Tab. II.2: Wirkungsweise und Konzentrationen der verwendeten Antagonisten.

5.7 Datenerfassung

Zur Datenerfassung und zur Steuerung des Versuchablaufes wurde die Imaginganalyse-Software „TILLvisiON“ verwendet. Dieses Programm bietet die Möglichkeit, wichtige Versuchsparameter im Voraus einzustellen. Die Fluoreszenz wurde jeweils bei einer Anregungswellenlänge von 344 nm gemessen; die Sammelrate betrug 0,1 Hz. Somit wurde mit der CCD-Kamera alle 10 s eine Momentaufnahme des Präparates gefertigt und an den Computer gesendet. Die Software ermöglichte sowohl die Zuordnung von Zahlenwerten je nach Fluoreszenzänderung, als auch deren graphische Darstellung. Der Verlauf der Graphen sowie aktuelle Fluoreszenzbilder konnten während des gesamten Versuchablaufes kontinuierlich verfolgt werden.

6 Histochemische Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz

6.1 Grundlagen der Immunfluoreszenz

Grundlegend für die histochemische Analyse eines Gewebes ist die Interaktion eines hochspezifischen mono- bzw. polyklonalen Antikörpers, meist vom Typ IgG, mit dem nachzuweisenden Antigen.

Antikörper bestehen aus zwei Antigen-bindenden Regionen ($= F_{ab}$) und einer kristallinen Region ($= F_c$). Die F_{ab} -Regionen sind in der Lage, spezielle Determinanten ($=$ Epitope) der Antigene zu erkennen und daran zu binden. Dadurch entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe (Harlow 1988), die mittels unterschiedlicher Methoden nachgewiesen werden können. Bei dem direkten Nachweis geschieht dies darüber, dass der verwendete Detektionsantikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Fluorophor) markiert ist. Regt man dieses Fluorophor mit Licht geeigneter Wellenlänge an, führt dies zu

langwelliger Emissionsstrahlung und somit zum Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes.

In den folgenden Studien erfolgte der Nachweis auf lichtmikroskopischer Ebene durch indirekte Immunfluoreszenz (Coons 1958). Hierfür wird zusätzlich zu dem antigenspezifischen Primärantikörper ein sekundärer Antikörper eingesetzt. Dieser Sekundärantikörper ist an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und mit seiner F_{ab} -Region gegen die F_c -Region des Primärantikörpers gerichtet. So entsteht ein Komplex aus Antigen, Primärantikörper und Sekundärantikörper. Indem man Primärantikörper unterschiedlicher Tierspezies mit geeigneten Sekundärantikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren verwendet, ist mit dieser Technik auch die gleichzeitige Detektion mehrerer Antigene möglich.

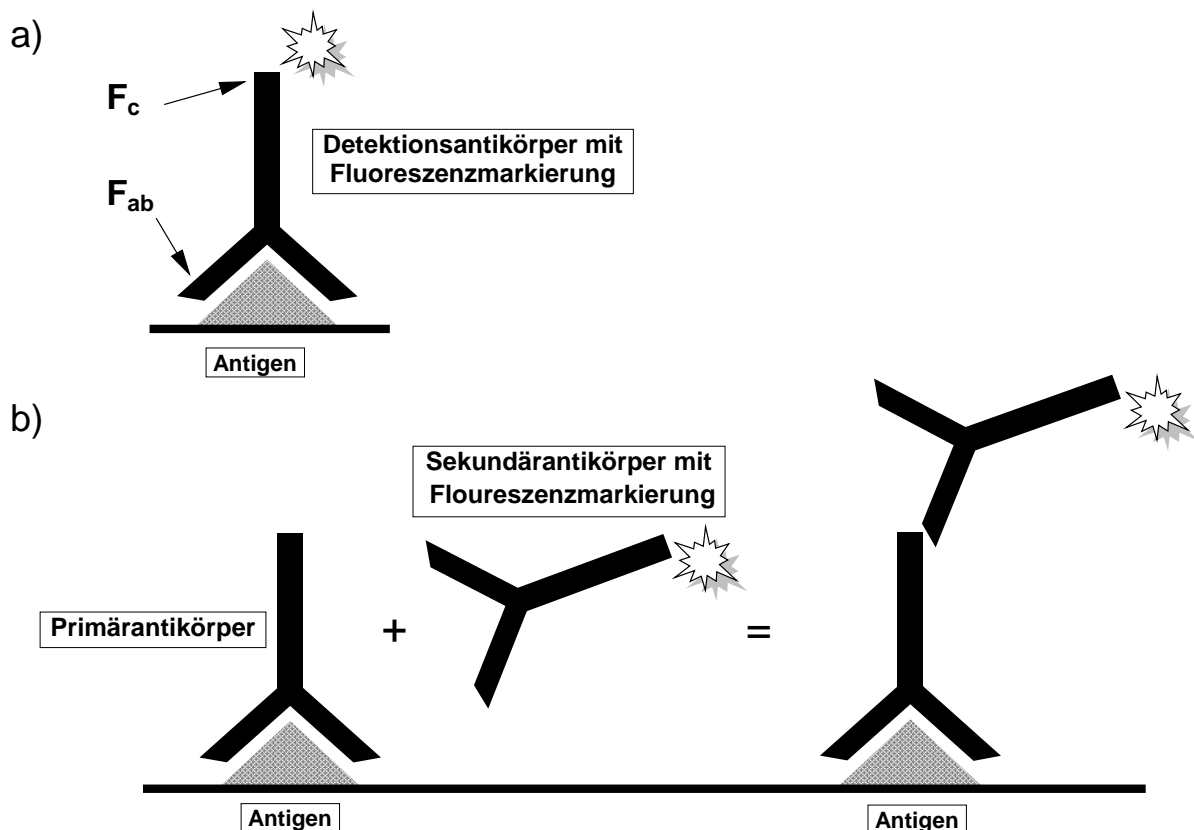


Abb. II.9: a) direkter Nachweis; b) indirekter Nachweis.

F_c = kristallines Fragment, F_{ab} = antigenbindendes Fragment

6.2 Fluoreszenzmarkierung

6.2.1 Kryofixierung des Gewebes

Das Gewebe wurde grundsätzlich wie in Kapitel II.4.1 beschrieben vorbereitet, jedoch nicht gestrippt. Anschließend wurde jeweils ein ca. 1,5 cm x 3 cm großes Stück Kolon mit Cyanacrylatkleber auf Plastikhalter befestigt (Schultheiss *et al.* 2002). Die Plastikhalter wurden dann horizontal in flüssige Gelatine gebettet. Wie für die Kryptenisolation (siehe Kapitel II.4.2) hatten auch die hierfür eingesetzten Plexiglashalter mittig eine ovale Aussparung. Zur Stabilisierung des Gewebes wurde randständig entlang dieser Aussparung das Gewebe mit einer Kanüle perforiert.

Nach Abkühlung und Festigung der Gelatine wurden ca. 1 cm x 1 cm große Gewebe-Gelatine-Blöcke mit einem spitzen Skalpell aus der Aussparung herauspräpariert. Mit dem Gefriereinbettmedium Tissue Tec[®] (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden die Blöcke auf Kork befestigt und für zwei Minuten in stickstoffgekühltes Isopentan (Temperatur ca. -160° C) eingetaucht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Blöcke bei -70° C aufbewahrt.

6.2.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden an dem Kryostaten HM 500 O (Microm, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Dieses Gefriermikrotom wurde auf eine Betriebstemperatur von -16° C in der Kühlkammer und -14° C für den Schnitthalter eingestellt. Das Gerät verfügt über einen beweglichen Objekthalter, auf welchem das Gewebe mit Tissue Tec[®] fixiert wurde. Die angefertigten Schnitte hatten eine Dicke von 16 µm; sie wurden direkt auf gelatinebeschichtete Objektträger übertragen und auf Eis aufbewahrt.

6.2.3 Das Färbeprotokoll

Bei allen immunhistochemischen Schnitten wurde eine Einfachmarkierung durchgeführt. Das Färbeprotokoll gliederte sich wie folgt (RT= Raumtemperatur):

1) Rehydrierung in Phosphatpuffer	3 x 5 min	RT
2) Blockung unspezifischer Bindungsstelle in Blockinglösung	2 h	RT
3) Erste Inkubation in der Primärantikörper-Lösung	24 h	4 ° C
4) Waschen in Phosphatpuffer	3 x 5 min	RT
5) Zweite Inkubation in der Sekundärantikörper-Lösung	1 h	RT
6) Waschen in Phosphatpuffer	3 x 5 min	RT
7) Kernfärbung in DAPI-Lösung	5 min	RT
8) Waschen in Phosphatpuffer	5 x 5 min	RT
9) Deckeln; je ein Tropfen Citifluor pro Gewebeprobe		RT

Für die Waschschritte wurden die Objektträger in Objektträgerhalter aufgestellt und in schwarze, verschließbare Küvetten mit einem Fassungsvermögen von 200 ml gegeben. Das Waschen erfolgte dann auf einem Schüttler des Typs Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach, Deutschland).

Zur Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper wurden die Objektträger mit den Schnitten nach unten weisend auf aus institutseigener Herstellung stammende Inkubationsplatten aus Polycarbonat ausgelegt. Während der Reaktionszeit wurden die Inkubationsplatten in einer geschlossenen, befeuchteten Metallkammer aufbewahrt. Da sich die verwendeten Lösungen in den Kapillarspalt zwischen Objektträger und Inkubationsplatte zogen, half diese Methode Substanzen einzusparen. Pro Objektträger wurden somit lediglich ca. 200 µl Lösung benötigt. Nach jedem Schritt wurden sowohl die Küvetten als auch die Inkubationsplatten gründlich mit Aqua dest. gespült und

getrocknet, um eine Verschleppung von Substanzen zu verhindern.

6.2.4 Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Rabbit anti-nitric oxide synthase I polyklonaler Antikörper	Kaninchen	1:1000	Chemicon International Hofheim, Detuschland
Rabbit anti-inducible nitric oxide synthase II polyklonaler Antikörper	Kaninchen	1:2000	
Rabbit anti-nitric oxide synthase III polyklonaler Antikörper	Kaninchen	1:1000	

Tab. II.3.: Verwendete Primärantikörper.

Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Cy3-conjugated affinipure donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Esel	1:800	Jackson ImmunoResearch Laboratories; USA West Grove

Tab. II.4.: Verwendeter Sekundärantikörper.

6.3 Mikroskopie

Die Analyse der Gewebeschnitte wurde an einem Nikon Eclipse 80i Mikroskop durchgeführt. Zur Erzeugung der benötigten Anregungswellenlängen verfügt das Mikroskop über spezielle Filterköpfe. Die Cy3-konjugierten Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 510 – 530 nm angeregt und emittierten Licht mit einer Wellenlänge von 630 – 660 nm. Zur Anregung des Kernfarbstoffs DAPI diente Licht der Wellenlänge 358 nm. Das emittierte Licht hatte dann eine Wellenlänge von 461 nm. Die Bilddokumentation erfolgte über eine digitale Schwarz/Weiß-Kamera (S/W camera Digital Slight DS 2 M BWc, Nikon, Deutschland). Mit Hilfe des Software-Programms NIS-Elements 2.30 (Nikon, Deutschland) wurden die Schwarzweißbilder entsprechend der emittierten Lichtfarbe eingefärbt. So sind Cy3-Signale immer rot dargestellt und DAPI-Signale blau. Das Fotografieren der betreffenden Gewebeausschnitte mit beiden Filtern und anschließender Überlagerung der Farbkanäle erleichterte die Lokalisation der Cy3-Signale.

Zur Befunddokumentation, zum Beispiel mittels einer Bildtafel, wurde gegebenenfalls eine Kontrastverstärkung oder ein Farbabgleich notwendig. Dazu wurde die Adobe Photoshop Imaging-Software verwendet.

7 Die Ussingkammer-Technik

7.1 Die Messkammer

Anfang der 1950er entwickelte der dänische Physiologe Hans H. Ussing die Kurzschlussstrom- oder Ussingkammertechnik, die eine Quantifizierung elektrogener Transportprozesse von Epithelien ermöglicht (Ussing & Zerahn 1951). Die heutigen Kammern entsprechen im Detail nicht mehr den Originalentwürfen von Ussing, weswegen man auch von „modifizierten Ussingkammern“ spricht (Abb. II.10).

Die für diese Versuchsreihen eingesetzten Kammern bestanden aus zwei Plexiglaskammerhälften, die mittels Plexiglasschrauben miteinander verbunden wurden. Im Bereich der Kontaktflächen der beiden Kammerhälften wurde ein dünner Silikonfilm aufgetragen, um einen wasserdichten Verschluss zu erhalten. Zwischen beide Hälften wurde ein Gewebestück mit einer Oberfläche von 1 cm^2 gespannt. Feine Metallstifte an der einen Kammerhälfte fixierten das Gewebe. Es fungierte somit als Grenzfläche zwischen zwei mit Pufferlösung gefüllten Kammerkompartimenten. Das Volumen der Kompartimente betrug jeweils 3,5 ml. An der Oberseite der Kammer war für jedes Kompartiment ein Zugang vorhanden, über welchen die Lösungen getauscht oder Wirkstoffe zugegeben werden konnten.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden das Gewebe und die Pufferlösungen über einen temperierten Wasserzulauf auf konstant 37°C gehalten. Eine ständige Begasung über zwei Gasfritten am Boden der Kammern sorgte für eine ausreichende Versorgung des Darmgewebes mit Carbogen und für einen konstanten pH-Wert von 7,4. Unter diesen Bedingungen bleiben die epithelialen Funktionen bis zu sechs Stunden nach Organentnahme erhalten ohne morphologische Veränderungen aufzuweisen (Diener *et al.* 1989).

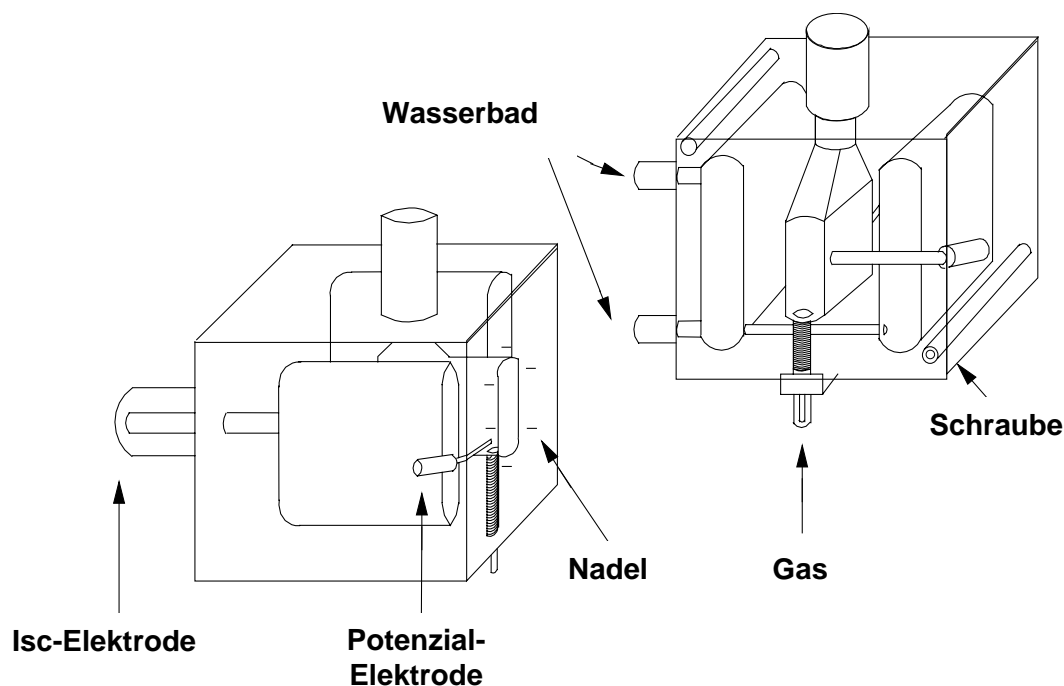


Abb. II.10: Schema einer modifizierten Ussingkammer.

7.2 Elektrische Messungen

Um mit Hilfe der oben beschriebenen Ussingkammer transepitheliale Potenzialänderungen messen zu können, entwickelten Ussing und Zehran ein Ersatzschaltkreismodell (Ussing & Zerahn 1951). In diesem System wird das eingespannte Gewebe als Widerstand bzw. Batterie betrachtet (Abb. II.11).

Ursprünglich erfolgte die Steuerung der Messanlagen über manuell regulierbare Batterien und Potentiometer. Zwischenzeitlich wurde eine spezielle Software („Winclamp“; Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland) entwickelt, die eine vollständige Steuerung des Systems per Computer ermöglicht und die elektrischen Parameter wie Kurzschlussstrom (I_{sc}), Gewebeleitfähigkeit (G_t = Kehrwert des Widerstandes; „t“ = tissue) oder transepitheliale Potenzialdifferenz (Pd) kontinuierlich erfasst.

Hierzu verfügten die Ussingkammern über zwei unterschiedliche

Elektrodenpaare, die über eine Agarbrücke (5 % (Gew/Vol) Agar in Parsons-Lösung) mit den Kammern verbunden waren. Ein Elektrodenpaar war nur 1 mm von dem Gewebe entfernt angebracht, um Messartefakte, bedingt durch einen Potenzialabfall durch den Lösungswiderstand, zu minimieren. Das zweite Elektrodenpaar (Ag/AgCl-Elektroden) diente der Stromapplikation und wurde möglichst weit von dem Gewebe entfernt angebracht, um eine gleichmäßige Stromdichte zu erzeugen.

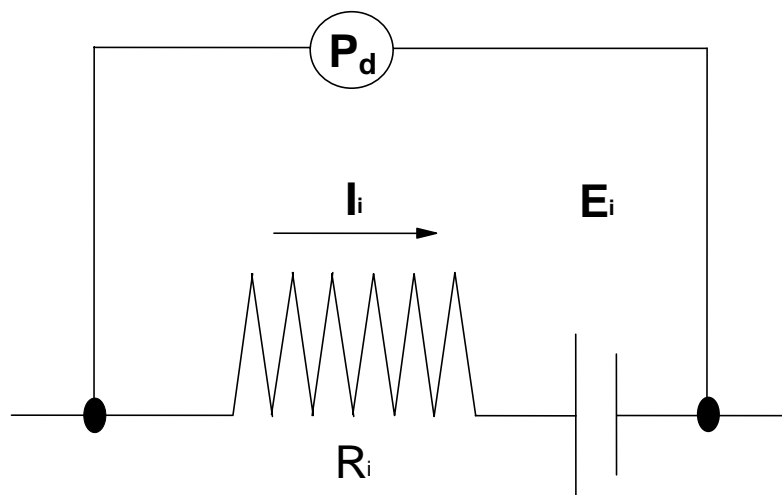


Abb. II.11: Elektrisches Schaltkreismodell.

Prinzip der Erfassung von elektrogenen Verschiebungen einer Ionenspezies. E_i = elektromotorische Kraft; R_i = Widerstand; I_i = Ionenfluss; P_d = Potenzialdifferenz

Die Messeinrichtung erlaubte das Umschalten zwischen zwei Modi (Abb. II.12):

- Open-circuit-Modus
- Voltage-clamp-Modus

Damit das Gewebe nach dem Einspannen zuerst unbeeinflusst wieder zu Gleichgewichtsbedingungen finden konnte, wurde bei jedem Versuch anfangs der **Open-circuit-Modus** gewählt. Bei diesem Modus erfolgt eine direkte Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz.

Typisch für das Kolongewebe der Ratte ist eine spontane Sekretion von Anionen, vor allem von Cl^- und HCO_3^- (Strabel & Diener 1995). Dadurch wird die Serosaseite gegenüber dem Lumen positiv aufgeladen. Nach ca. 1 min wurde dann in den **Voltage-clamp-Modus** gewechselt. Durch Einspeisen eines Stromes kann hierbei das transepitheliale Potenzial Pd auf einen beliebigen Wert eingestellt werden. Um passive Ionenbewegungen durch den elektrischen Gradienten zu verhindern, wurde in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen eine besondere Form des Voltage-clamps verwendet, der **short-circuit-Modus**. Mit einem kompensatorischen Strom, dem so genannten *Kurzschlussstrom* ($I_{\text{sc}} = I_{\text{short-circuit}}$), wird das Pd auf 0 mV geklemmt. Der I_{sc} entspricht in seiner Größe somit der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen an dem Epithel. Eine unter diesen Bedingungen gemessene Zunahme des I_{sc} ist damit immer auf einen aktiven oder sekundär aktiven Transport zurückzuführen. Dieser entspricht entweder einem Netto-Kationentransport von mukosal nach serosal oder einem Netto-Anionentransport in die entgegengesetzte Richtung. Der I_{sc} wurde in $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (mit $1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) als Ladungsverschiebung pro Zeit und freier Gewebefläche angegeben.

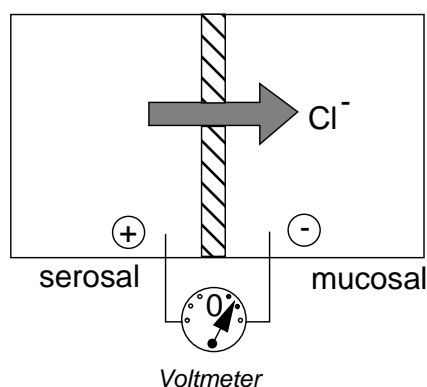
Zur vollständigen Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften des Gewebes wurden zusätzlich der Gewebewiderstand (R_t ; mit t = tissue) und die Gewebeleitfähigkeit (G_t) ermittelt. Hierzu wirkten während der Messungen im Voltage-clamp-Modus Stromimpulse mit einer Amplitude von $\pm 50 \mu\text{A}$ für eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe ein. Mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes konnte nun aus der resultierenden Potenzialdifferenz der Gewebewiderstand (R_t) errechnet werden:

$$\text{Spannung (U)} = \text{Widerstand (R)} \cdot \text{Strom (I)} \text{ und somit } R_t = U/I.$$

Daraus ergibt sich für die Gewebeleitfähigkeit (G_t): $G_t = I/U$; sie entspricht also dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes (R_t).

a)

Open-circuit:



b)

Voltage-clamp:

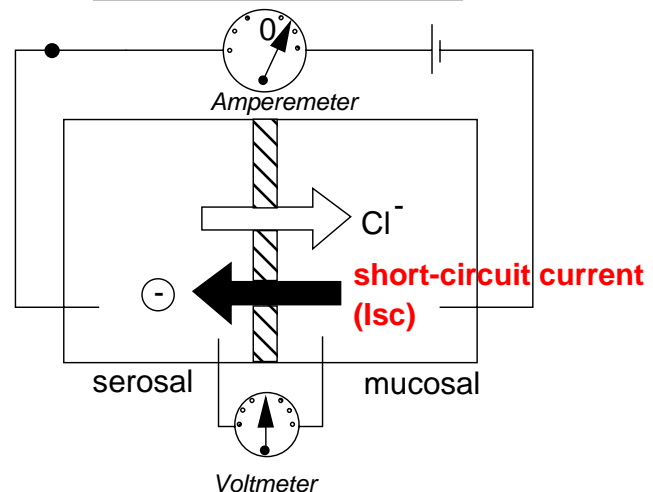


Abb. II.12: a) Open-circuit-modus; b) Voltage-clamp-Modus.

7.3 Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Zu Beginn jeden Versuches wurde beidseitig des Gewebes die unter Kapitel II.2.1.1 beschriebene 107 mmol l^{-1} NaCl $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ KCl Parsons-Lösung eingesetzt und eine Äquilibrationsphase von 60 min bis zur Stabilisierung des Gewebewiderstandes unter short-circuit-Bedingungen eingehalten. Anschließend wurde die basolaterale Membran depolarisiert, indem serosal die Parsons-Lösung durch eine kaliumreiche $111,5 \text{ mmol l}^{-1}$ KCl-Lösung (siehe Kapitel II.2.4.1) ersetzt wurde. Daraufhin erfolgte mucosal ein Wechsel in eine 107 mmol l^{-1} KGluc-Lösung (siehe Kapitel II.2.4.2) um einen Chloridgradienten von serosal nach mucosal zu erzeugen und somit den Chloridausstrom zu forcieren. Dieser wurde nach ca. 30 Minuten mittels Zugabe von Carbachol stimuliert. Das Acetylcholderivat Carbachol wurde in einer Konzentration von

$5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt.

Bei einem Teil der Versuche wurde das Gewebe 30 Minuten lang mit dem Alkaloid Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5} \cdot \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) beziehungsweise mit Cytochalasin D ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vorinkubiert und erst anschließend Carbachol zugegeben. Über den Computer wurden alle 6 s die Messwerte von P_d , I_{sc} und G_t erfasst und gespeichert. Am Ende des Versuches wurden die Minutenwerte und deren graphische Darstellung ausgedruckt. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten in ein Tabellen-Kalkulations-Programm (Lotus 123) exportiert.

Als Basallinie (*Baseline*) galt der Kurzschlussstrom unter basalen Versuchsbedingungen, der aus den letzten drei Minutenwerten vor Substanzzugabe ermittelt wurde. Der höchste Wert nach Substanzzugabe wurde als *Peak* gewertet.

8 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Originalwerte oder als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (= SEM, standard error of the mean) wiedergegeben. Bei der Darstellung der Daten als Balkendiagramm zeigt die Höhe der Balken den Mittelwert und der Fehlerbalken den SEM an. Im Sinne der Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken grundsätzlich nur in einer Richtung abgebildet. N gibt die Anzahl der untersuchten Krypten wieder und n die Anzahl der gemessenen Regions of interest (ROIs).

Für den Vergleich verschiedener Gruppen miteinander wurde eine ANOVA (= Analysis of variancies) durchgeführt. Die Signifikanzen wurden daraufhin durch eine lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test ermittelt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Erwiesen sich Gruppen als statistisch homogen, so wurden diese in den Abbildungen mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet. Die Berechnung erfolgte mit der Statistik Software StatMost™ 3.5 (Dataxiom Software Inc., Los Angeles, USA).

III Ergebnisse

1 Das Versuchsprotokoll: Messungen unter depolarisierten Bedingungen

Die dominante Antwort von nativen Kolonepithelzellen auf eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration besteht im Öffnen von basolateralen, Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen, durch deren Öffnung die Membran hyperpolarisiert, was den Ausstrom von Cl^- über spontan offene, apikale Cl^- Kanäle (in der Hauptsache vom Typ CFTR) verursacht (Böhme *et al.* 1991; Greger 2000). Um solche indirekte Effekte durch Änderungen der Triebkraft für die Chloridbewegung auszuschalten, wurden die Epithelzellen durch Superfusion mit einer K^+ -reichen Lösung ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl-Lösung; siehe Kapitel II.2.2) depolarisiert, wodurch sich das Membranpotenzial auf Werte um 0 mV einstellt (Schultheiss & Diener 1998). Um einen Cl^- -Ausstrom zu energetisieren, wurde die Cl^- -Konzentration in einem zweiten Schritt extrazellulär reduziert, indem Cl^- durch ein impermeables Ion, das Gluconat ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KGluc-Lösung; siehe Kapitel II.2.2), ersetzt wurde.

Abbildung III.1 zeigt am Beispiel einer typischen Originalkurve den Versuchsaufbau. Nach einer kurzen Stabilisierungsphase in der NaCl-Lösung erfolgte der Wechsel in die KCl-Lösung zur Depolarisation. Nachdem sich die Zellen in dieser Hochkaliumlösung erneut bei einer Baseline stabilisiert hatten, wurde Carbachol ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) appliziert. Anschließend wurde durch Superfusion mit der KGluc-Lösung der Chloridgradient angelegt. Unmittelbar nach dem Wechsel in die chloridfreie KGluc-Lösung erfolgte ein massiver Ausstrom von Chlorid, erkennbar an der Zunahme der Fluoreszenzintensität von MEQ. Die Zugabe von Carbachol induzierte eine Änderung der cytosolischen Cl^- -Konzentration ($\Delta [\text{Cl}^-]_i$) von ca. $27 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Den Abschluss des Versuches bildete die in Kapitel II.5.3 erläuterte Eichung des MEQ-

Signals. Alle dazu verwendeten Lösungen sind in Kapitel II.2.2 beschrieben.

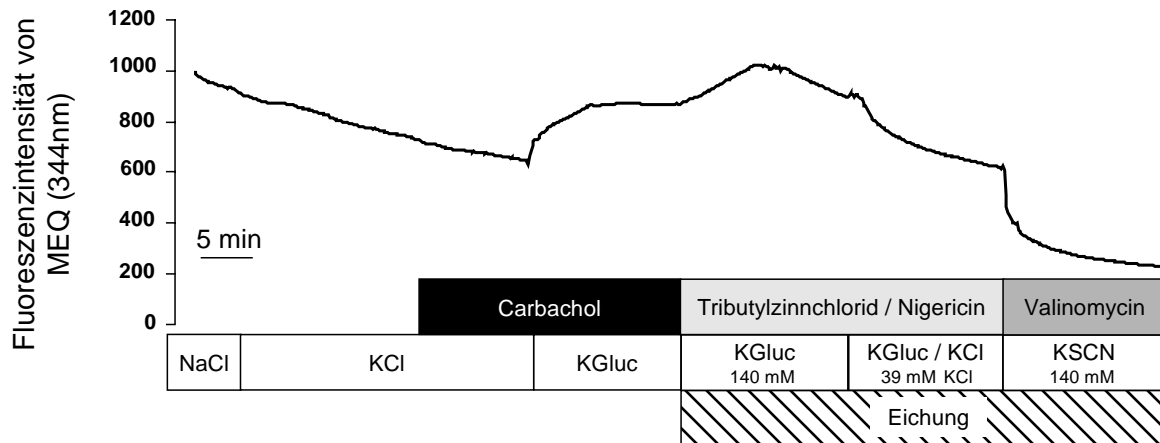


Abb. III.1: Carbachol-induzierte Erhöhung des MEQ-Signals.

Carbachol wurde in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt. Der Anstieg des MEQ-Signals (d.h. der Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration) erfolgte erst nach dem Anlegen eines Chloridgradienten durch den Wechsel in die nominell chloridfreie KGluc-Lösung. Im Anschluss erfolgte eine Kalibrierung des MEQ-Signals durch Superfusion der Krypte mit Lösungen verschiedener Cl^- -Konzentration in Anwesenheit der Ionophoren Tributylzinn ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), Nigericin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und Valinomycin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; siehe Methoden). Typisches Beispiel von $N = 5$; $n = 46$ mit $N = \text{Anzahl der Krypten}$ und $n = \text{Anzahl gemessener ROIs}$. Statistik s. Abb. III.2.

1.1 Aktivierung eines Chloridausstromes durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Um zu überprüfen, ob Ca^{2+} der entscheidende Faktor für den Carbachol-stimulierten Ausstrom von Chlorid ist, wurde folgender Versuchsansatz gewählt: die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde durch den aus dem Bakterium *Streptomyces globatus* stammenden Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; zur Wirkweise des Ionomycin, siehe Toeplitz *et al.* 1979) erhöht. Um den Ca^{2+} -Einstrom zu forcieren, wurde die Ca^{2+} -Konzentration in den Perfusions-Lösungen auf $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ angehoben.

Wie Abbildung III.2 zeigt, fällt in der zeitabhängigen Kontrolle, in der die Krypten lediglich mit der Cl^- -freien KGluc-Lösung ohne Ionomycin superfundiert wurden, $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ um ca. $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ab. Enthielt die KGluc-Lösung

hingegen zusätzlich Ionomycin, betrug die Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration ca. $35 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, war also um das Dreifache stärker ($p < 0,05$). Diese Änderung von $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ ist vergleichbar mit der durch Carbachol induzierten Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration von ca. $27 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

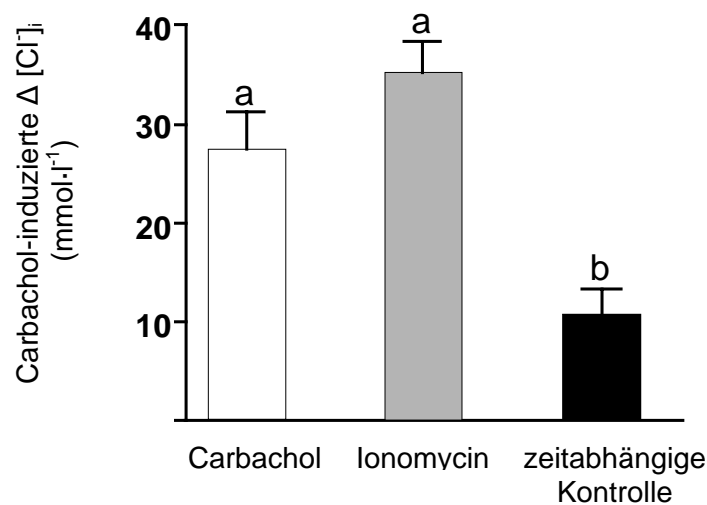


Abb. III.2: Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration durch Ca^{2+} -abhängige Sekretagoge.

Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; weiße Säule) und Ionomycin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in Gegenwart von $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$; graue Säule) induzieren einen Abfall der intrazellulären Cl^- -Konzentration ($\Delta [\text{Cl}^-]_i$), der signifikant über demjenigen der zeitabhängigen Kontrolle (schwarze Säule) liegt. Statistisch homogene Gruppen sind mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet (Varianzanalyse gefolgt von Scheffé-Test). Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM dar, $N = 5$, $n = 42-57$ mit N = Anzahl der Krypten und n = Anzahl gemessener ROIs. * = $p < 0,05$ versus zeitabhängige Kontrolle.

Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist also in der Lage, den Carbacholeffekt nachzuahmen.

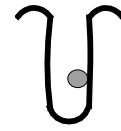
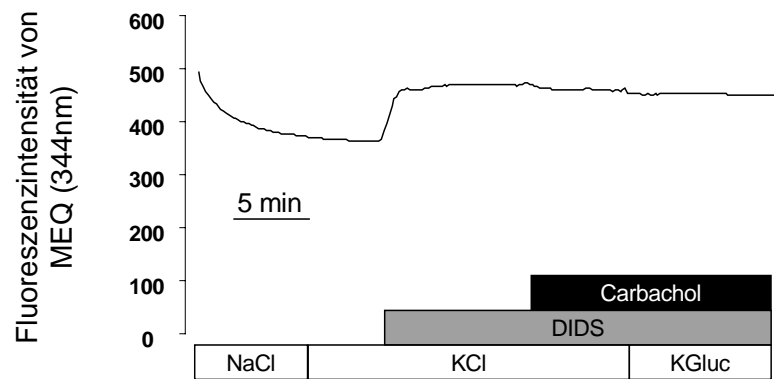
1.2 Beteiligung von CaCC-Kanälen an der Carbachol-induzierten Chloridsekretion

Wie aus der Literatur bekannt ist, sind Stilbene in der Lage, Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle (CaCC) zu blocken (Nilius *et al.* 1997; Nilius *et al.* 2003). Auch der durch Carbachol induzierte Abfall von $[\text{Cl}^-]_i$ konnte mittels Vorbehandlung der Krypten mit Stilbenen gehemmt werden (siehe Abb.III.4).

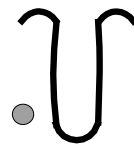
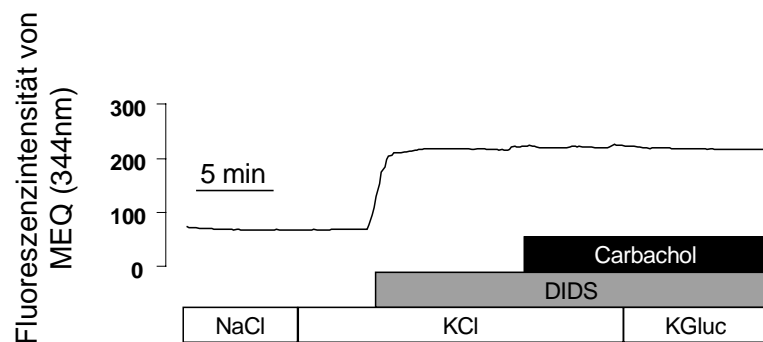
Aufgrund der Eigenfluoreszenz von SITS und DIDS (siehe Abb. III.3) wurde in dieser Versuchsserie auf eine Quantifizierung des MEQ-Signals, d.h. auf eine Umrechnung der Fluoreszenzwerte in Änderungen der intrazellulären Cl^- Konzentration, verzichtet. Daher ist die Änderung der Fluoreszenzintensität (Δ Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 344 nm) von MEQ dargestellt.

SITS (4-Acetamido-4'-isothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonsäure; $10^3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führte zu einer deutlichen Reduktion des Chloridausstroms: In Gegenwart dieses Inhibitors betrug der durch Carbachol-induzierte Anstieg des MEQ-Fluoreszenz weniger als die Hälfte im Vergleich zum Anstieg unter Kontrollbedingungen (siehe Abb. III.4, $p < 0,05$). Ein anderes Stilben, DIDS (4,4'-Diisothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonsäure; $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), u.a. ein Inhibitor eines ClCa des bovinen respiratorischen Epithels (Ran & Benos 1992), hemmte den Chloridausstrom sogar vollständig (siehe Abb.III.3). Beide Stilbene gelten jedoch auch als Inhibitoren des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers (Ikuma *et al.* 2003). Unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen (Superfusion mit HCO_3^- -freien Lösungen) konnte dieser Austauscher jedoch nicht aktiv werden. Die starke Verringerung des Carbacholeffektes, vor allem durch DIDS, indiziert somit, dass die CaCC-Kanäle den Carbachol-induzierten Chloridausstrom tragen.

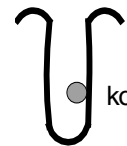
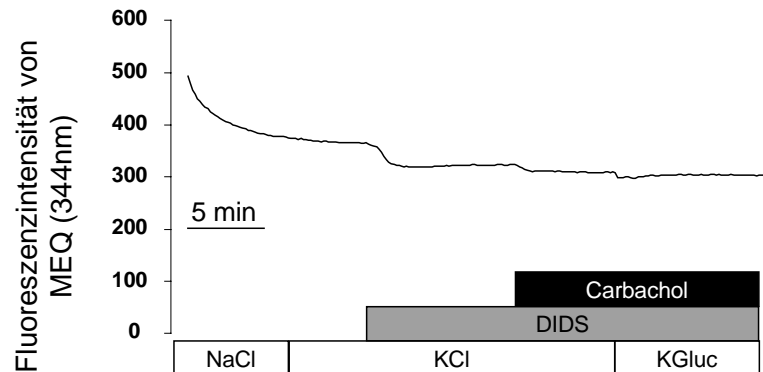
1)



2)



3)



U = Krypte
● = ROI

Abb. III.3: Vollständige Hemmung der Carbacholantwort durch DIDS.

Bild 1) zeigt die Originalkurve beispielhaft für die Versuchsreihe. Unmittelbar nach Zugabe von DIDS ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) steigt das Fluoreszenzsignal an. Die Applikation des Agonisten Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führt zu keiner weiteren Reaktion der Zelle. In Bild 2) ist die Originalkurve einer ROI ohne Zelle abgebildet. Es wird deutlich, dass durch Zugabe von DIDS die Hintergrundfluoreszenz aufgrund der Eigenfluoreszenz des Stilbens stark ansteigt. Um den eigentlichen Versuchsablauf verfolgen zu können wurde der Wert des Anstiegs der Fluoreszenzmessung aufgrund dieser Eigenfluoreszenz des Stilbens von der Originalmessung subtrahiert. Dies ist in Bild 3) dargestellt. Statistik siehe Abbildung III.4.

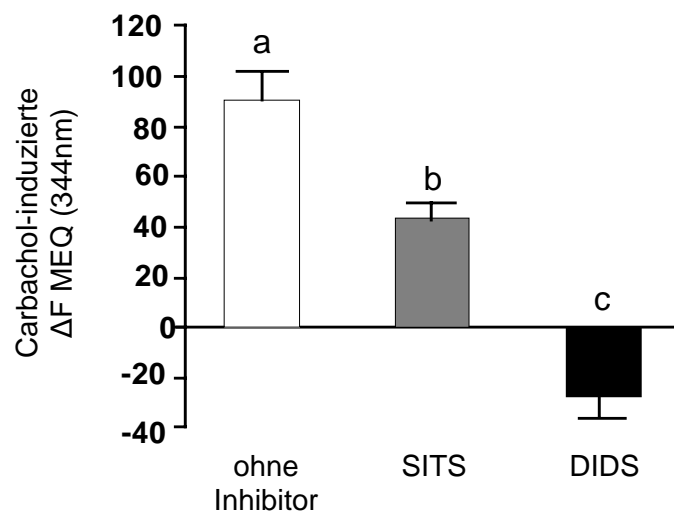


Abb. III.4: Hemmung des Carbacholeffekts durch SITS und DIDS.

Anstieg des Fluoreszenzsignals (ΔF) des Halid-sensitiven Farbstoffs MEQ durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Abwesenheit von Inhibitoren (linke Säule) oder in Anwesenheit von SITS ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mittlere Säule) oder DIDS ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechte Säule). Aufgrund der Eigenfluoreszenz von SITS und DIDS konnte die intrazelluläre Chloridkonzentration und damit $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ nicht berechnet werden. Daher ist die Änderung der Fluoreszenzintensität von MEQ (ΔF MEQ 344 nm) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren statistisch unterschiedliche Gruppen. $P < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM (Varianzanalyse gefolgt von Scheffé-Test); $N = 5$; $n = 46 - 77$ pro Versuchsgruppe mit $N =$ Anzahl der Krypten und $n =$ Anzahl gemessener ROIs.

1.3 Kryptenachse

Das Kolonepithel zeichnet sich durch einen massiven Gradienten hinsichtlich der Zellreifung aus: am Kryptenfundus sitzen die jungen, proliferierenden Zellen, deren bei der Zellteilung entstehenden Tochterzellen innerhalb weniger Tage entlang der Kryptenachse zu Oberfläche wandern, wo sie dann durch Apoptose verloren gehen (Lipkin 1987). Dabei kommt es zu massiven Änderungen in den Transporteigenschaften der Zellen (Köckerling & Fromm 1993; Köckerling *et al.* 1993).

Daher stellte sich die Frage, ob die Zellantwort auf Carbachol entlang der Kryptenachse unterschiedlich stark ausfällt. Dazu wurden in Imaging-Versuchen an drei verschiedenen Abschnitten der Krypte (Fundus, Mitte und Oberflächenregion) durchgeführt.

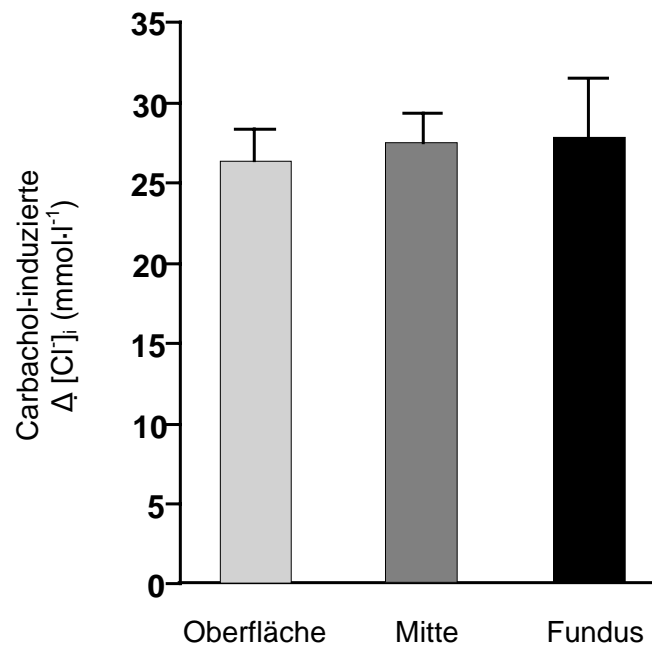


Abb. III.5 Vergleich der Änderung von $[\text{Cl}^-]_i$ entlang der Kryptenachse.

Im Vergleich der drei Regionen Oberfläche, Mitte, Fundus der Krypte zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) stimulierten Abfall von $[\text{Cl}^-]_i$. $N = 5 - 8$, $n = 57 - 93$ mit $N =$ Anzahl der Krypten und $n =$ Anzahl gemessener ROIs. Mittelwerte \pm SEM (Varianzanalyse gefolgt von Scheffé-Test).

Wie aus Abbildung III.5 ersichtlich, existiert kein signifikanter Unterschied der Reaktionsstärke entlang der Kryptenachse (Oberfläche $\Delta [\text{Cl}^-]_i = 26,3 \pm 1,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; Mitte: $\Delta [\text{Cl}^-]_i = 27,4 \pm 1,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; Fundus: $\Delta [\text{Cl}^-]_i = 27,6 \pm 3,42 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; Statistik siehe Abb. III.5). Somit scheint der durch Carbachol stimulierte Chloridausstrom nicht von dem Differenzierungsgrad der Epithelzelle abhängig zu sein. Daher wurden für alle folgenden Versuche Daten aus verschiedenen Abschnitten der Krypte gepoolt.

1.4 Vergleich mit Forskolin

Um die Amplitude der durch Carbachol-induzierten Änderung der intrazellulären Cl^- -Konzentration mit der anderer Sekretionswege vergleichen zu können, wurde Forskolin eingesetzt, welches als Stimulator der Adenylcyclase wirkt (Seamon & Daly 1981), und darüber cAMP-vermittelte CFTR-Kanäle öffnet (Übersicht siehe: Greger 2000).

Der folgende Originalkurvenverlauf zeigt den kompletten Versuchsablauf, beginnend mit einer Stabilisierungsphase in der $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Lösung. Anschließend wurden die Membranen mit der kaliumreichen KCl-Lösung depolarisiert und schließlich Forskolin ($5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) appliziert. Nachdem sich ein stabiles Plateau eingestellt hatte wurde die Badlösung gegen die ebenfalls kaliumreiche KGluc-Lösung ausgetauscht. Diese enthielt Forskolin in der gleichen Konzentration ($5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Wie deutlich an dem Anstieg der Fluoreszenzkurve zu erkennen ist, war es möglich mittels Forskolin einen Abfall der intrazellulären Cl^- -Konzentration, d.h. eine Cl^- -Sekretion, zu induzieren (Abb. III.6).

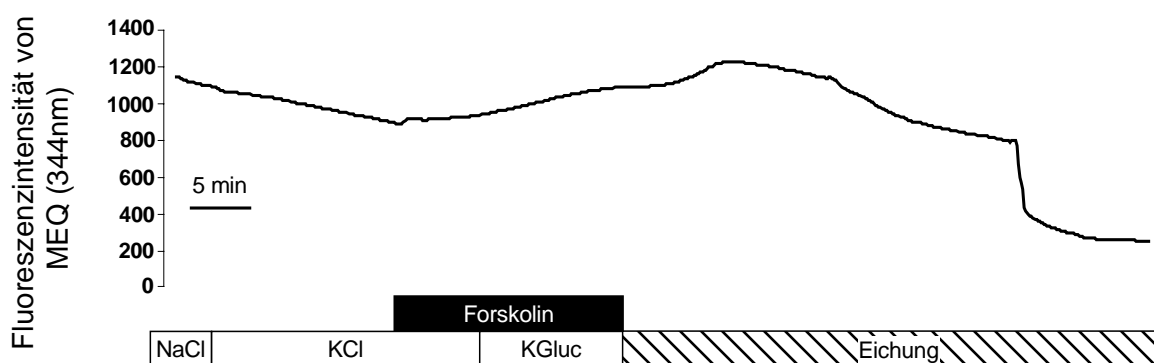


Abb. III.6: Forskolin induzierte Änderung der MEQ-Fluoreszenzintensität.

Forskolin ($5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; schwarzer Balken) induziert eine Zunahme der Fluoreszenz des Halid-sensitiven Farbstoffs MEQ unter depolarisierten Bedingungen (Superfusion mit $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl Tyrode), die sich nach Wechsel in eine Cl^- -freie Superfusionslösung ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KGluc Tyrode) verstärkt. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für N (Anzahl der Krypten) = 6; n (Anzahl gemessener ROIs) = 68. Statistik siehe Abb.III.7.

Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung des CFTR-Kanals für den Forskolin-induzierten Chloridausstrom verantwortlich ist, wurde Glibenclamid, ein Blocker dieses Kanals (Sheppard & Welsh 1992), eingesetzt. Wie aus Abb. III.7 hervorgeht, hemmte Glibenclamid ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) den Forskolin-induzierten Abfall signifikant ($p < 0,05$), aber nicht vollständig. Dies legt die Beteiligung von CFTR-Chloridkanälen nahe, zeigt aber auch, dass noch andere Transporter beteiligt sein müssen.

Forskolin kann zudem den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1), der unter physiologischen Bedingungen der Cl^- -Aufnahme in die Zelle dient, stimulieren (siehe z.B.: Diener *et al.* 1996). Da sich unter den gewählten Bedingungen (Na^+ - und Cl^- -freies Perfusionsmedium) dieser Cotransporter in seiner Arbeitsrichtung umdrehen wird, wurde getestet, ob Bumetanid, ein Blocker von $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransportern (Kaplan *et al.* 1996), ebenfalls in der Lage ist, den Forskolin-induzierten Abfall von $[\text{Cl}^-]_i$ zu vermindern. In der Tat reduzierte Bumetanid ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) den Effekt von Forskolin ebenfalls um ca. die Hälfte (Abb. III.7).

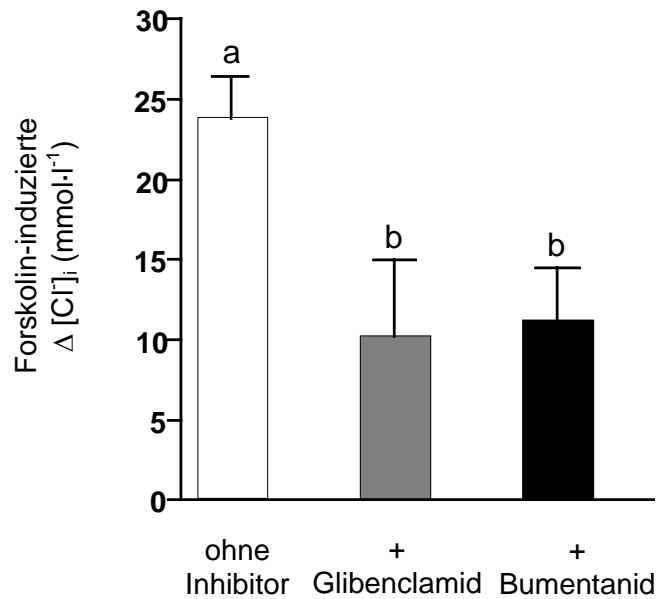


Abb. III.7: Forskolin-induzierter Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration.

Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration ($\Delta [\text{Cl}^-]_i$) durch Forskolin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Abwesenheit von Inhibitoren (linker Balken) und in Anwesenheit von Glibenclamid ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mittlerer Balken) oder Bumetanid ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken). Unterschiedliche Buchstaben (a, b) symbolisieren statistisch unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$); statistisch homogene Gruppen sind mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet (Varianzanalyse gefolgt von Scheffé-Test). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $N = 6$, $n = 55 - 81$ mit N = Anzahl der Krypten und n = Anzahl gemessener ROIs.

2 Signaltransduktion

Die Experimente, die in Kapitel III.1 beschrieben wurden, belegen, dass ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einen Stilben-sensitiven Chloridausstrom, messbar als Abfall von $[\text{Cl}^-]_i$, auslöst. Er wird also durch das Öffnen von Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanälen verursacht. In den folgenden Versuchsserien sollte nun die Signalkaskade zur Aktivierung des CaCC ermittelt werden.

2.1 Die „klassischen“ Ca^{2+} -Signalkaskaden

Grundsätzlich spielt Ca^{2+} in zwei „klassischen“ Signalkaskaden eine wichtige Rolle: dem Ca^{2+} /Calmodulin-Weg und der IP_3 -Signalkaskade. Da es zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen am wahrscheinlichsten erschien, dass einer dieser beiden Signalwege an der Übermittlung des Carbachol-Signals an die Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle beteiligt ist, stellten sie als erste den Gegenstand der weiteren Experimente dar.

2.1.1 Calcium/Calmodulin- Weg und Phospholipase C- Signalkaskade

Im ersten Versuchsansatz sollte mittels Hemmung von Calmodulin durch Calmidazolium, ein Derivat des Antimykotikums Miconazol (Fischer *et al.* 1987), die Rolle des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes und der darauf basierenden Signalkaskade für die Aktivierung des CaCC überprüft werden.

Dazu wurde nach der Stabilisierungsphase in der KCl-Perfusions-Lösung Calmidazolium in einer Konzentration von $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ appliziert. Nachdem sich eine stabile Baseline eingestellt hatte, wurde der Perfusionslösung zusätzlich Carbachol ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zugefügt. Es folgte der Wechsel in die KGluc-Perfusions-Lösung, die ebenfalls Calmidazolium und Carbachol enthielt. Die resultierende $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ betrug $23,9 \pm 2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

(Abb. III.8) und unterschied sich somit nicht signifikant von der Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration ausschließlich mit Carbachol stimulierter Krypten ($\Delta [\text{Cl}^-]_i = 29,7 \pm 3,9 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Calmodulin scheint also bei der Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle keine Rolle zu spielen.

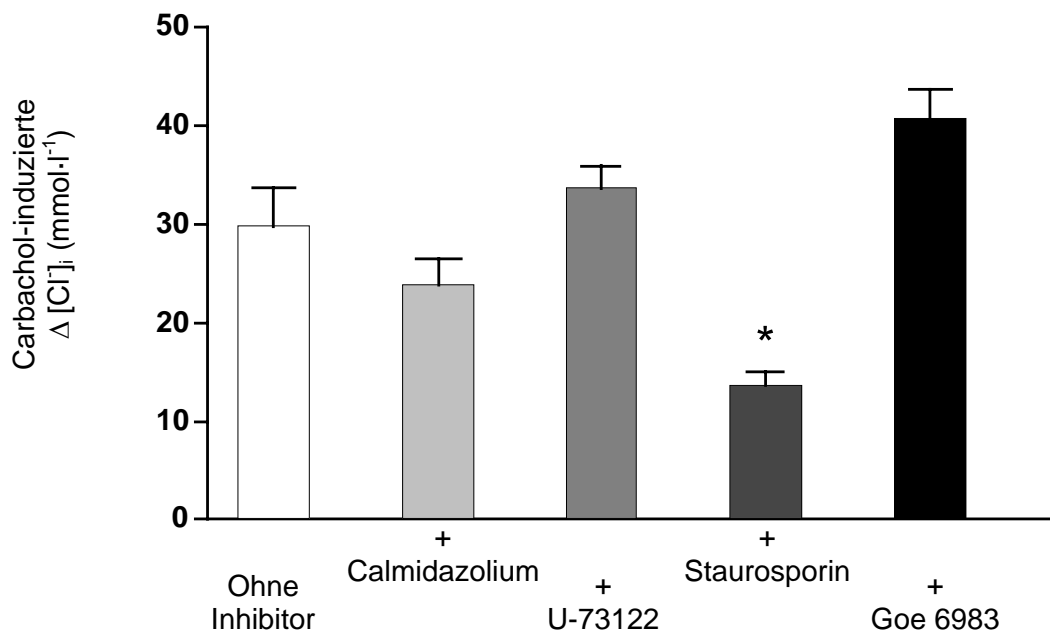


Abb. III.8: Wirkung von Hemmstoffen der klassischen Ca^{2+} -Signaltransduktionswege auf den Carbacholeffekt.

Dargestellt ist der Abfall der intrazellulären Cl^- -Konzentration durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Abwesenheit von Inhibitoren (weiße Säule) und in Gegenwart von Calmidazolium ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), U-73122 ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Staurosporin ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) oder Gö 6983 ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Werte sind $N = 4 - 6$, $n = 46 - 75$ für jede Gruppe mit N = Anzahl der Krypten und n = Anzahl gemessener ROIs; * = $p < 0,05$ versus Kontrolle ohne Inhibitor-Vorbehandlung.

Auch dem Proteinkinase C-Weg scheint keine wesentliche Bedeutung zuzukommen. So ließ sich beispielsweise die Wirkung von Carbachol nicht durch das Diacylglycerol-Analog OAG (2-Acetyl-1-oleoyl-sn-glycerol), einem Aktivator von vielen Formen der PKC (Brose *et al.* 2004), nachahmen. Superfusion der Krypten mit OAG ($1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) erzeugt einen Abfall von $[\text{Cl}^-]_i$ um $-9,1 \pm 2,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($N = 4$, $n = 48$), einem Wert, der sich nicht signifikant von der zeitabhängigen Kontrolle unterschied.

Die Blockade der Phospholipase C mit U-73122 (10^{-6} mol·l⁻¹; zur Wirkung siehe: Taylor & Broad 1998) zeigte ebenfalls keine Hemmwirkung auf die Carbachol-induzierte $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ (Abb. III.8). Allerdings konnte Staurosporin, ein Blocker der Proteinkinase C (Tamaoki *et al.* 1986; Wilkinson & Hallam 1994), die Carbachol-induzierte Antwort um die Hälfte reduzieren (Abb. III.8). Eine Beteiligung der PKC konnte somit nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Auch eine Beteiligung atypischer PKC erschien möglich. Der Einsatz von 2-[1-(3-dimethylpropyl)-5-methoxyindol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimide, kurz Gö 6983, einem Blocker der cPKC-Subtypen $\alpha\beta\gamma$ sowie der aPKC ζ (Chow *et al.* 2000), diente der Überprüfung, ob die aufgeführten PKC in der Signalübertragung involviert sind. Wie in Abbildung III.8 dargestellt, war Gö 6983 nicht in der Lage, den Chloridausstrom zu blockieren, somit sind weder die cPKC noch die aPKC ζ in die Signalkaskade involviert.

2.2 Alternativer Signalweg: NO-Synthasen (NOS)

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass die klassischen Ca^{2+} -Signalkaskaden nicht entscheidend an der Aktivierung des Carbachol-induzierten Cl^- -Ausstroms beteiligt sind. Bei der Überlegung welche weiteren Signalwege in Betracht gezogen werden müssen, erschien die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) mit anschließender Signalweiterleitung als naheliegendste Möglichkeit, da Interaktionen von Ca^{2+} mit NO-produzierenden Enzymen (NO-Synthasen, NOS) von anderen Zellen bekannt sind (Wang *et al.* 1999).

2.2.1 Funktionelle Bedeutung der NOS in der Signalkaskade

Inwieweit NO-Synthasen eine Rolle bei der Carbachol-Antwort der Kolon-Krypten der Ratte spielen, sollte in den folgenden Imaging-Experimenten geklärt werden. Dazu wurde Carbachol durch Nitroprussid im bereits

erläuterten Versuchsschema (siehe Kapitel III.1.2) ersetzt. Nitroprussid ist ein NO-Donor (Wilson *et al.* 1993). Ziel der Versuche war es, zu überprüfen, ob Nitroprussid in der Lage ist, den Carbachol-Effekt nachzuahmen.

In der Imaging-Versuchsreihe führte die Gabe von Nitroprussid (10^{-4} mol·l⁻¹) zu einem signifikanten Abfall von $[Cl^-]_i$ um $-24,7 \pm 3,0$ mmol·l⁻¹ (N = 5, n = 42); ein Effekt, der in etwa so stark war wie derjenige von Carbachol (siehe Abb. III.1).

Die Synthese von NO erfolgt über NO Synthasen (NOS). Von ihnen sind mehrere Formen bekannt: die neuronale NOS (n-NOS, NOS-1), die induzierbare NOS (i-NOS, NOS-2) und die endotheliale NOS (e-NOS, NOS-3) (Alderton *et al.* 2001). In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Gewebe vor der Stimulation mit Carbachol mit Blockern von NO-Synthasen inkubiert. Verwendung fanden hierbei Derivate von L-Arginin: L-NNA ist nachgewiesener Blocker der e-NOS und n-NOS. L-NMMA inhibiert alle NOS-Formen inklusive der i-NOS (Dwyer *et al.* 1991; Reif & McCreedy 1995; Arzumanian *et al.* 2003). In der Tat hemmte L-NMMA (10^{-4} mol·l⁻¹), der Blocker, der alle bekannten NOS-Isoformen inhibiert, die Carbacholantwort signifikant, während L-NNA, das eine deutlich schwächere Hemmwirkung auf die i-NOS hat (Dwyer *et al.* 1991), unwirksam war. Dies lässt eine Beteiligung dieser Isoform des Enzyms bei der Signaltransduktion vermuten (siehe Tab. III.1).

Inhibitoren	Konzentration (mol·l ⁻¹)	Carbachol-induzierte $\Delta [Cl^-]_i$ (mmol·l ⁻¹)	N / n
L-NNA	10^{-4}	$-33,9 \pm 3,00$	6 / 95
L-NMMA	10^{-4}	$-13,9 \pm 2,0 *$	5 / 45

Tab. III.1: Auswirkung der Inhibitoren der NOS auf die Carbacholantwort.

L-NNA hatte keinerlei Einfluss auf die Carbacholantwort. L-NMMA reduzierte die Chloridsekretion signifikant. N = Anzahl der Krypten und n = Anzahl gemessener ROIs. * = $p < 0,05$ versus Carbachol; Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,05$ (Varianzanalyse gefolgt von Scheffé-Test).

2.2.2 Immunhistochemische Lokalisation der NOS-Isoformen

Wie die Imaging-Versuche zur funktionellen Bedeutung der NOS zeigen (Kapitel III 2.2.1), stellen diese möglicherweise einen Teil der Signalkaskade bei der Carbacholwirkung dar. Mittels immunhistochemischer Färbung sollte nun die Lokalisation der unterschiedlichen NOS-Typen im Kolonepithel der Ratte morphologisch untersucht werden.

Zur besseren Orientierung wurden alle Gewebeschnitte mit DAPI angefärbt. DAPI bindet an AT-reiche Regionen der DNS und stellt die Zellkerne dadurch blau dar (Kubista *et al.* 1987). Die Nuklei der Kryptenepithelzellen befinden sich im basalen Drittel der Zellen, der apikale Bereich ist folglich mit Zytoplasma angereichert. In allen folgenden immunhistologischen Abbildungen befindet sich die Kryptenoberfläche und somit das Lumen des Darmes im oberen Bildabschnitt. Im unteren Bildabschnitt ist der Kryptenfundus mit der sich anschließenden Lamina muscularis mucosae zu sehen. Zwischen den Krypten zieht die Lamina propria bis zum Oberflächenepithel. Die primären Antikörper (siehe Tabelle II.3) wurden durch Kopplung an den Sekundärantikörper Cy3-conjugated affinipure donkey anti-rabbit IgG sichtbar gemacht.

In Abbildung III.9 ist die Färbung der n-NOS dargestellt. Deutlich sind die Cy3-Signale, kennzeichnend für den n-NOS-Primärantikörper, entlang der gesamten Kryptenachse zu erkennen. Vor allem im Bereich der apikalen Zellmembran und im Oberflächenepithel ist eine starke Markierung zu sehen. Aber auch im Bereich der Lamina muscularis mucosae sind Signale auszumachen.

Die Lokalisation der i-NOS zeigt Abbildung III.10. Auch hier verteilt sich das Signal entlang der gesamten Kryptenachse. Vor allem im Cytoplasma und auch in der Zellmembran sind deutlich Signale zu sehen. Im Vergleich zur n-NOS scheint das Signal in der Lamina muscularis mucosae stärker zu sein.

Im Unterschied zur Verteilung der n-NOS und der i-NOS zeigt Abbildung III.11, dass die e-NOS hauptsächlich im Bereich des Oberflächenepithels vorliegt. Auch in der Lamina propria und in der Lamina muscularis mucosae sind Signale zu erkennen. Das Kryptenepithel im Bereich des Fundus und der Kryptenmitte weist jedoch keine Signale auf.

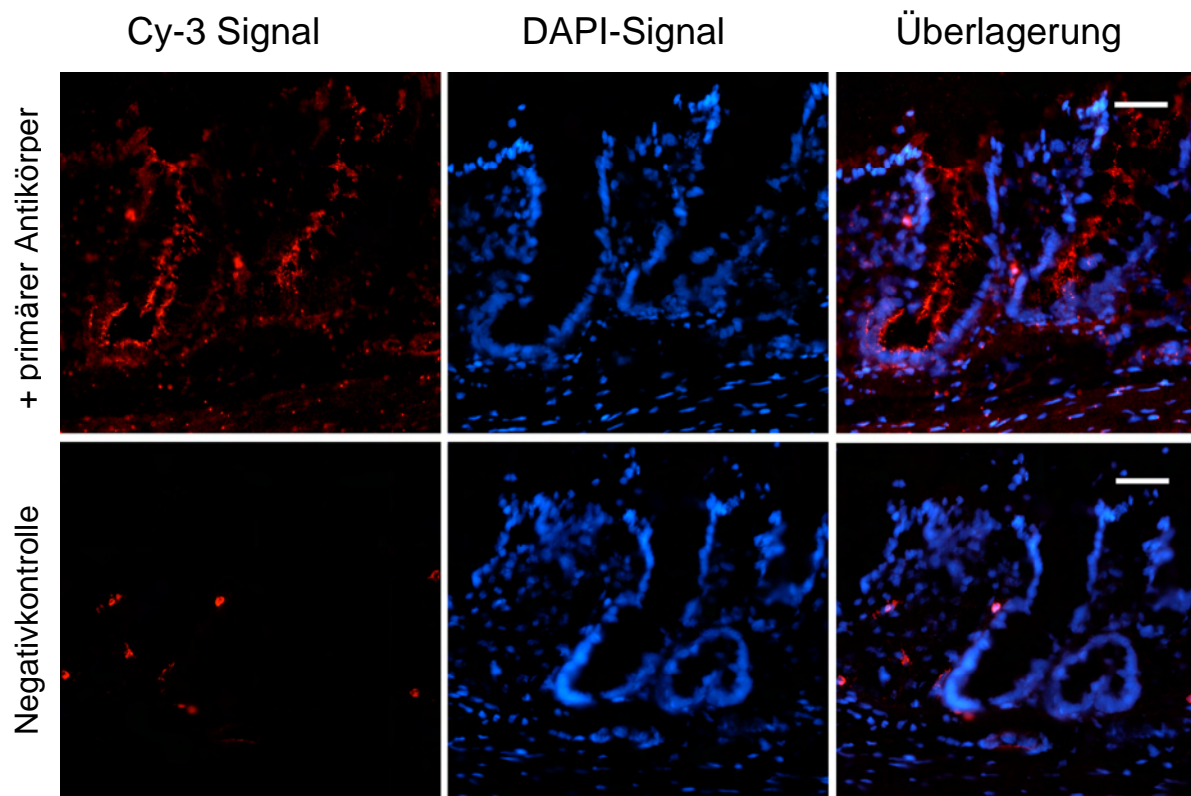


Abb. III.9: n-NOS-Signal im Kolonepithel.

Die Abbildung zeigt die Verteilung der neuronalen NOS (n-NOS) in der Kolonwand der Ratte. Wie auch in allen nachfolgenden immunhistochemischen Darstellungen, befindet sich die zum Darmlumen weisende Kryptenoberfläche im oberen Bildabschnitt, der Kryptenfundus mit anschließender Lamina muscularis mucosae liegt im unteren Bildabschnitt. Spalte eins stellt das Cy3 donkey-anti rabbit IgG-Signal dar. In Spalte zwei ist der Kryptenverlauf durch die bläuliche Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI ersichtlich. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung des Cy3-Signals und der DAPI-Färbung. Die erste Zeile zeigt den untersuchten Gewebeabschnitt nach Einsatz des primären Antikörpers. Nach Kopplung des n-NOS-Antikörpers an den Cy3 donkey-anti rabbit IgG ergibt sich die rote Färbung. Vor allem in der apikalen Membran der Kolonepithelzellen ist ein deutliches Signal zu erkennen. In der unteren Zeile ist die dazugehörige Negativkontrolle abgebildet. Eichbalken: 50 μ m.

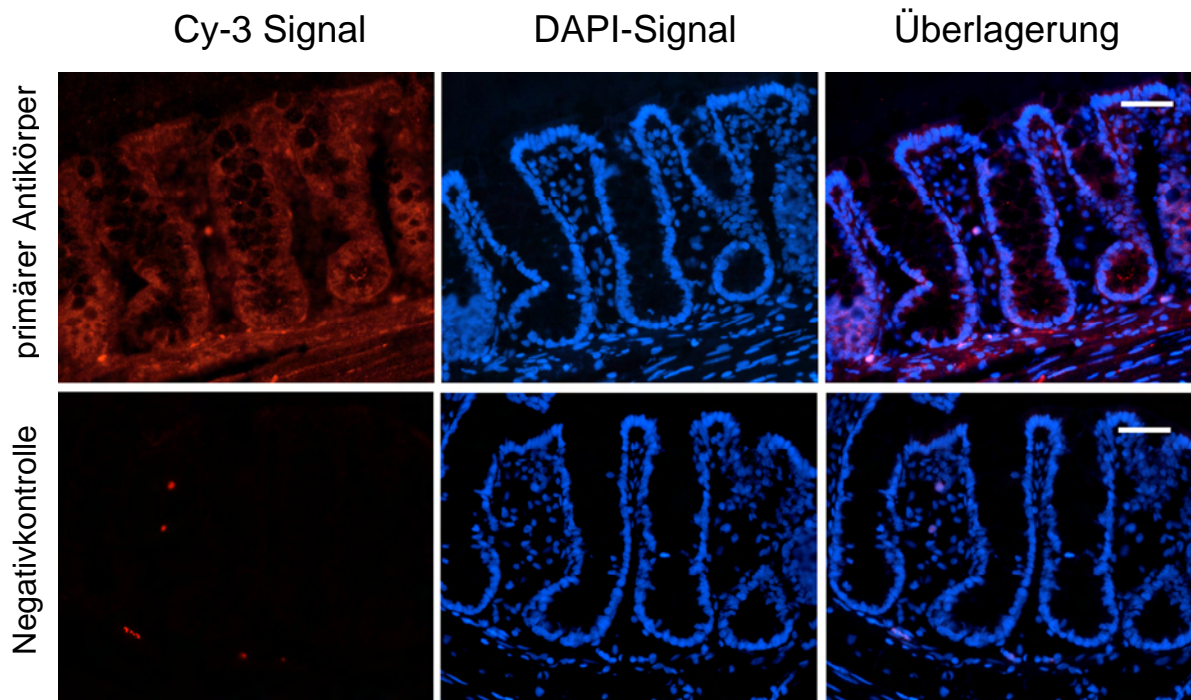


Abb. III.10: i-NOS-Signal im Kolonepithel.

Wie in Abbildung III.9. ist in der ersten Spalte das Cy3 donkey-anti rabbit IgG-Signal zu sehen. Spalte zwei zeigt die DAPI-Färbung der Zellkerne und in der dritten Spalte ist die Überlagerung der beiden Signale dargestellt. In der oberen Zeile ist das i-NOS-Signal nach Bindung des primären Antikörpers an den Cy3 donkey-anti rabbit IgG als rote Färbung zu erkennen. Die i-NOS scheint sowohl in dem Cytoplasma als auch in der apikalen Membran der Kolonepithelzellen vorhanden zu sein. In der unteren Zeile ist die entsprechende Negativkontrolle abgebildet. Oberer Bildabschnitt: Darmlumen; unterer Bildabschnitt: Kryptenfundus; Eichbalken: 50 μm .

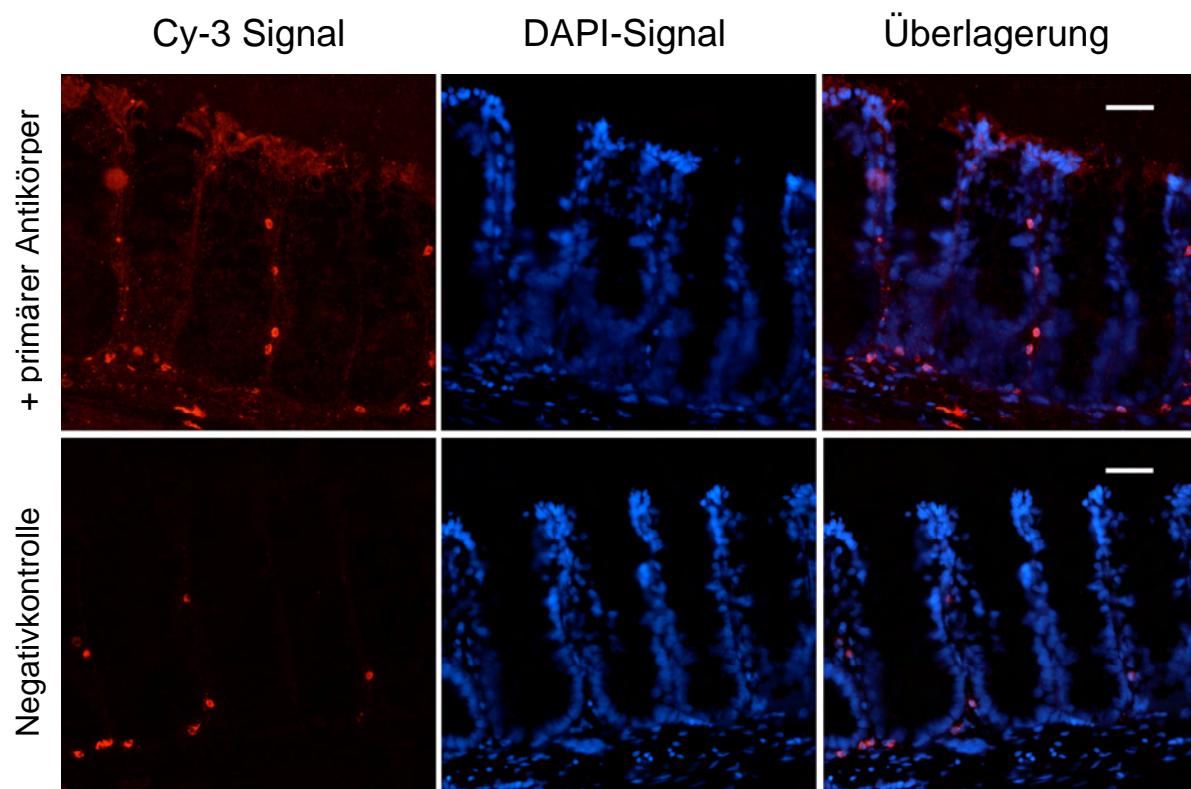


Abb. III.11: e-NOS-Signal im Kolonepithel.

Spalte eins zeigt das Signal des Cy3 donkey-anti rabbit IgG, Spalte zwei die DAPI-Färbung der Kerne und Spalte drei die Überlagerung der Signale. In Zeile eins ist die e-NOS nach Kopplung von dem primären Antikörper an den Cy3 IgG rot dargestellt. Die Lokalisation ist vorrangig auf das Oberflächenepithel der Krypten beschränkt. Die zweite Zeile zeigt die Negativkontrolle. Oberer Bildabschnitt: Lumen; unterer Bildabschnitt: Kryptenfundus, Eichbalken: 50 μm .

2.3 Das Cytoskelett

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, stellen die NOS einen Schritt innerhalb der Signalkaskade zur Aktivierung der Carbachol-induzierten Chloridsekretion dar. Gerade die funktionellen Experimente mittels Imaging-Technik zeigten jedoch, dass der Ca^{2+} -abhängige Chloridkanal nicht einzig von den NOS reguliert werden kann, da NOS-Blocker nur einen Teil der Carbacholantwort inhibierten. Auch von Anteilen des Cytoskeletts ist bekannt, dass sie an der Regulation von Ionenkanälen und Transportern beteiligt sind (Janmey 1998), z.B. über die Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras nach Stimulation muscarinerger Rezeptoren (Seger & Krebs 1995), wie etwa an der Niere für einen Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter gezeigt (Robey *et al.* 2001).

2.3.1 Einfluss der Mikrotubuli auf den CaCC

Mikrotubuli entstehen durch Polymerisation. Die kleinsten Untereinheiten sind α -Tubulin und β -Tubulin. Diese lagern sich im Verhältnis 1:1 zu Heterodimeren zusammen, die wiederum durch Aneinanderlagerung Protofilamente bilden. Die Protofilamente sind polarisiert, das schnell wachsende Ende wird als Plus-Ende bezeichnet und das langsam wachsende als Minus-Ende. In vivo bilden meist 13 helical angeordnete Protofilamente ein Mikrotubulum (Moritz & Agard 2001; Musch 2004). Mikrotubuli spielen in vielen Signalkaskaden eine wichtige Rolle. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des chloridabhängigen Na^+/H^+ -Austauschers unter hyperosmolaren Bedingungen durch die Zerstörung der Mikrotubuli teilweise unterbunden wird (Miyata *et al.* 2000). Des weiteren erleichtern intakte Mikrotubuli die Ausschüttung von Insulin (Boyd *et al.* 1982).

Inwieweit Mikrotubuli an der Signalkaskade zur Aktivierung des Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanals im Kolon der Ratte beteiligt sind, wurde zuerst in Imaging-Experimenten untersucht. Die Krypten wurden mit Inhibitoren, welche

die Tubulinpolymerisation hemmen, für 30 min vorbehandelt. Dabei handelte es sich um Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bzw. Nocodazol ($3,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Colchicin, das Gift der Herbstzeitlosen, unterbindet die Polymerisation von Mikrotubuli. Das schnell wachsende Plus-Ende des Mikrotubulums hat eine höhere Affinität zum Colchicin als das Minus-Ende. Nach Bindung des Colchicins erfolgt keine weitere Anlagerung von Tubulin an das betroffene Mikrotubulum (Margolis & Wilson 1977; Andreu *et al.* 1998). Auch Nocodazol führt zur Zerstörung von Mikrotubuli (Bajnath *et al.* 1995); es bindet hochspezifisch an Arg 390 von β -Tubulin (Kirsch-Volders *et al.* 2003). Wurde unter diesen Bedingungen Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) appliziert, war der cholinerge Agonist nicht mehr in der Lage, einen Abfall der intrazellulären Cl^- -Konzentration auszulösen. Die Änderung von $[\text{Cl}^-]_i$ lag nur noch auf dem Niveau der zeitabhängigen Kontrolle (Tab. III.2).

Hemmstoff	Konzentration ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	Carbachol-induzierte $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	N / n
Colchicin	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$-12,2 \pm 2,8$	6 / 70
Nocodazol	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$-9,8 \pm 2,0$	6 / 44

Tab. III.2: Wirkung Mikrotubuli-depolymerisierender Substanzen in Imaging-Experimenten.

Sowohl Colchicin als auch Nocodazol verringern komplett die Abnahme der $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ nach Stimulation mit Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und unter depolarisierten Versuchsbedingungen. N = Anzahl der Krypten und n = Anzahl gemessener ROIs. Mittelwerte \pm SEM (Varianzanalyse nach Scheffé).

Die Hemmung der Aktivierung des Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Stroms durch Mikrotubuli-Inhibitoren wurde mit einer unabhängigen Methode, der Ussingkammer, am intakten Epithel verifiziert. Um einen Cl^- -Strom über die apikale Membran direkt messen zu können, wurde die basolaterale Membran durch eine K^+ -Depolarisation elektrisch „ausgeschaltet“ und ein Cl^- -Strom über

diese Membran durch Anlegen eines Cl^- -Konzentrationsgradienten angetrieben (siehe Inset in Abb. III.12 zur Illustrierung des Versuchsprotokolls). Unter diesen Bedingungen löst Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) einen Stilben-sensitiven Anstieg des Kurzschlussstroms (I_{sc}) aus (Schultheiss *et al.* 2005, siehe Abb. III.12). Allerdings ist der Zeitverlauf der Carbacholwirkung am intakten Epithel ein anderer als in den Imaging-Experimenten an isolierten Krypten: der Anstieg des I_{sc} ist nur transient; ihm folgt eine langanhaltende Hemmphase, wahrscheinlich bedingt durch eine Inhibition des apikalen CFTR Kanals.

Aus Abbildung III.12 wird ersichtlich, dass der I_{sc} -Anstieg, d.h. das Öffnen apikaler Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanäle, durch Vorbehandlung mit Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ für 30 min) signifikant (Tab. III.3) gehemmt wird.

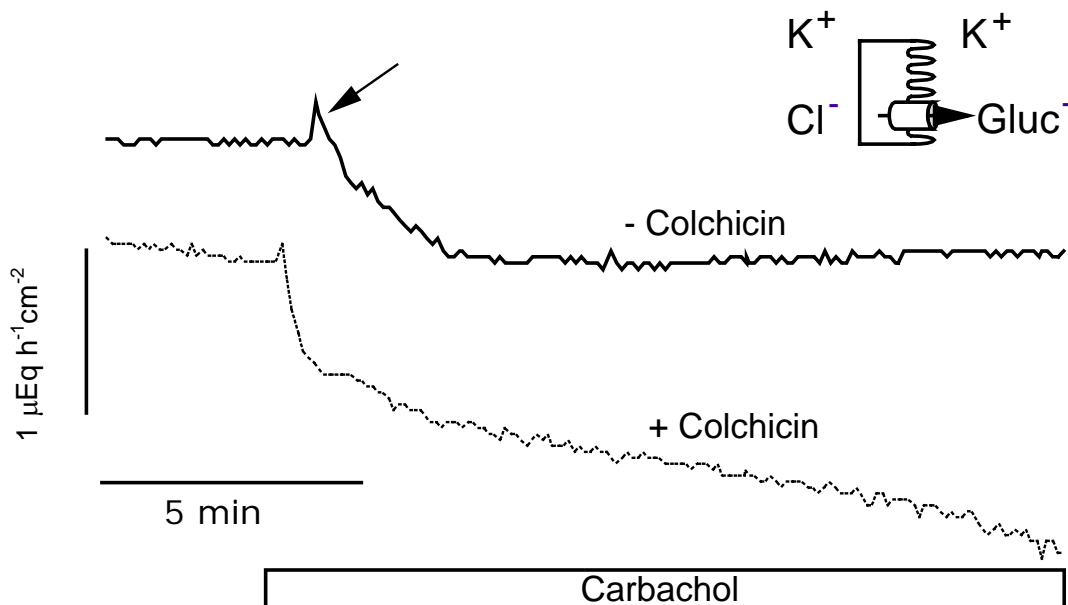


Abb. III.12: Stimulation eines Cl^- -Stroms durch die apikale Membran.

Die Stimulation erfolgte durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal; weißes Rechteck). Die unterbrochene Linie stellt den Kurvenverlauf unter Kontrollbedingungen dar, die durchgezogene Linie zeigt den Verlauf nach Vorbehandlung mit Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ für 30 min). Die Gewebe waren basolateral depolarisiert ($111,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl serosal) und ein Cl^- -Strom wurde durch Anlegen eines Cl^- -Gradienten ($107 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluconat/ $4,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl auf der mucosalen Seite) angetrieben (siehe auch Schema der Versuchsbedingungen oben rechts). Typischer Versuch für 8 bzw. 9 Experimente in An- bzw. Abwesenheit von Colchicin; Statistik siehe Tabelle III.3.

	Carbacholantwort mit Colchicin	Carbacholantwort ohne Colchicin	n
$\Delta I_{SC_{Peak}}$ ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$0,026 \pm 0,019^*$	$0,23 \pm 0,086$	8 - 9
$\Delta I_{SC_{10\text{ min}}}$ ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$-1,07 \pm 0,13$	$-1,27 \pm 0,14$	8 - 9

Tab. III.3: Wirkung von Colchicin in der Ussingkammer.

Dargestellt ist der maximale Anstieg des Isc, den Carbachol ($5\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) induziert ($I_{SC_{Peak}}$), sowie der sich nach 10 min einstellende Abfall des Isc ($I_{SC_{10\text{ min}}}$). Die Werte sind dargestellt als Unterschied (Δ) zur Grundlinie direkt vor Zugabe von Carbachol. Die Versuche wurden *mit* (linke Spalte) und *ohne* (rechte Spalte) Vorbehandlung mit Colchicin ($2,5\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für 30 min) durchgeführt. $*$ = $p < 0,05$ versus Effekt von Carbachol ohne Vorbehandlung mit Colchicin; n = Anzahl der untersuchten Gewebe.

2.3.2 Einfluss der Actinfilamente auf den CaCC

Actin, ein mittelgroßes, aus 375 Aminosäuren bestehendes Protein, kann grundsätzlich in zwei Formen vorliegen. Zum einen als G-Actin (globuläres Actin), und zum anderen als F-Actin (filamentöses Actin), das nach Polymerisation von G-Actin entsteht und die typischen Actinfilamente des Cytoskeletts ausmacht.

Um festzustellen, ob an der Regulation des Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanals am Rattenkolon Actinfilamente beteiligt sind, wurden zwei Toxine verwendet, die speziell am F-Actin der Zelle angreifen. Dabei handelte es sich einerseits um Cytochalasin D, das in den Polymerisationsprozess des Actins eingreift. Actinfilamente sind polarisiert und weisen an den beiden Enden unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf. Am Plus-Ende wächst die Kette schneller als am Minus-Ende. Die Polymerisation stellt sich außerdem als ein dynamischer Prozess dar: wird am Plus-Ende ein G-Actin angehängt, löst sich am Minus-Ende ein G-Actin ab. Cytochalasin D blockiert am Plus-Ende die Polymerisation, weshalb es zur allmählichen Depolymerisation des Actinfilaments kommt (Lin *et al.* 1980).

Bei dem anderen Toxin handelte es sich um Jasplakinolide, das ursprünglich aus dem marinen Schwamm *Jaspis johnstoni* gewonnen wurde.

Jasplakinolide bindet an das F-Actin und verhindert die Depolymerisation des Filamentes. Dadurch kommt es zur Versteifung des Cytoskeletts (Bubb *et al.* 1994; Bubb *et al.* 2000; Star *et al.* 2002; Haggie *et al.* 2004).

Die Beteiligung von Actinfilamenten an der Signalkaskade zur Aktivierung des Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanals wurde sowohl mittels Imaging-Technik an isolierten Kolonkrypten als auch an intaktem Gewebe in Ussingkammer-Versuchen überprüft. Dazu erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit den genannten Toxinen und anschließend die Stimulation durch Carbachol. In Tabelle III.4 sind die Ergebnisse der Imaging-Versuche dargestellt. Die Inkubation mit den Cytoskelett-Toxinen erfolgte in der KCl-Lösung. Jasplakinolide wurde mit einer Konzentration von $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ eingesetzt (Bubb *et al.* 1994) und zeigte eine deutliche Hemmung des Carbachol-induzierten Chloridausstroms. Cytochalasin D ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; zur Wirkung siehe: Young *et al.* 1997) hingegen war wirkungslos.

Toxin	Konzentration ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Carbachol-induzierte $\Delta [\text{Cl}]_i$ ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	N / n
ohne		$-27,6 \pm 3,42$	5 / 45
Cytochalasin D	10^{-5}	$-20,0 \pm 1,80$	5 / 83
Jasplakinolide	10^{-6}	$-14,7 \pm 1,81^*$	5 / 75

Tab. III.4: F-Actin wirksame Cytoskelett-Toxine in Imaging-Experimenten.

Jasplakinolide (10^{-6} für 30 min) vermindert die Änderung der $\Delta [\text{Cl}]_i$ nach Carbachol-stimulation ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) signifikant, Cytochalasin D (10^{-5} für 30 min) ist wirkungslos. N = Anzahl der Krypten und n = Anzahl gemessener ROIs. * = $p < 0,05$ versus Carbachol; Mittelwerte \pm SEM (Varianzanalyse nach Scheffé).

IV Diskussion

Durch den funktionellen Nachweis von CaCCs am Kolongewebe von Ratten mit der Technik der Ussingkamer (Schultheiss *et al.* 2005) drängte sich die Frage nach der Bedeutung dieser Leitfähigkeit für die Sekretion von Chlorid auf. Dies, sowie die Eingrenzung einer möglichen Signalkaskade zur Aktivierung der CaCCs, stellten den Gegenstand meiner Untersuchungen dar.

1 Stimulation einer Chloridleitfähigkeit an isolierten Krypten

Zu Beginn der Versuche war es notwendig experimentelle Voraussetzungen zu finden, unter denen die calciumaktivierte Chloridleitfähigkeit an isolierten Krypten der Ratte mit der Imaging-Technik messbar war. Um den CaCC am Kolongewebe der Ratte mittels Ussing-Kammer-Technik funktionell nachweisen zu können, depolarisierten Schultheiß *et al.* das Epithel basolateral (Schultheiss *et al.* 2005). Aufgrund mangelnder Triebkraft für Kalium konnten Einflüsse des cytoplasmatischen Calcium auf die Leitfähigkeit von Kalium nun nicht mehr zur Änderung des Kurzschlussstroms (I_{sc}) beitragen (Schultheiss & Diener 1997). Zusätzlich wurde über das Gewebe ein chemischer Gradient von serosal nach mucosal aufgebaut, um die Triebkraft für die Chloridbewegung durch apikale Anionenkanäle zu erhöhen (Schultheiss *et al.* 2005).

Auch für den funktionellen Nachweis des CaCC mit der Imaging-Technik war es nötig depolarisierte Bedingungen sowie einen chemischen Chloridgradienten zu verwenden. Denn durch Applikation von Carbachol in einer $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumchlorid-Lösung war es nicht möglich einen Abfall der $[\text{Cl}^-]_i$ zu zeigen (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen ist der stimulierte Ausstrom von Chlorid zu klein, um von der Imaging-Technik erfasst zu werden. Daher wurden alle Versuche in K^+ -reichen Superfusionslösungen

durchgeführt, in deren Gegenwart sich das Membranpotenzial der Kryptenzellen auf 0 mV einstellt (Schultheiss & Diener 1998). Dadurch konnte die Beeinflussung der Messergebnisse durch indirekte Effekte des Stimulators Carbachol (Öffnung von Kaliumkanälen und darüber Anstieg der Triebkraft für den Chloridausstrom) ausgeschaltet werden. Zusätzlich wurde der Chloridefflux durch eine annähernd chloridfreie Kaliumgluconat-Lösung energetisiert.

Mit Forskolin, das die Adenylatcyclase aktiviert und dadurch den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht, war es ebenfalls möglich die $[Cl^-]_i$ zu senken (siehe Abb. III.6). Im Unterschied zu Carbachol stellte sich der Forskolin-vermittelte Effekt bereits in der chloridhaltigen KCl-Lösung ein. Durch den Wechsel in die chloridfreie Kaliumgluconat-Lösung wurde der Ausstrom von Chlorid zusätzlich forciert. Dies zeigt zum einen, dass die Forskolin-induzierte Reaktion nicht von dem Chloridgradienten abhängig ist. Zum anderen unterstützt es die These, dass Carbachol und Forskolin unterschiedliche Strukturen für den Chloridtransport ansprechen (Schultheiss *et al.* 2005).

Da Forskolin den CFTR aktiviert (Sheppard & Welsh 1992), lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine von CFTR-Kanälen getragene Antwort handelt. Dies bestätigte sich darin, dass der Forskolin-Effekt signifikant durch Glibenclamid, einen Blocker dieses Kanals (Sheppard & Welsh 1992), reduziert werden konnte. Der Ausstrom von Chlorid wurde jedoch nicht vollständig verhindert. Da Forskolin auch den $Na^+/K^+/Cl^-$ Kotransporter (NKCC1) aktiviert (Diener *et al.* 1996), setzte ich Bumetanid als Blocker dieses Transporters ein (Kaplan *et al.* 1996). Auch dieser Inhibitor reduzierte die Forskolinantwort signifikant ohne den Chloridausstrom ganz zu unterbinden. Somit scheint der NKCC1 unter den gegebenen Versuchsbedingungen seine Transportrichtung zu ändern und Chlorid nicht

mehr in das Cytoplasma zu bringen, sondern aus der Zelle heraus zu transportieren. Dies bedeutet, dass Forskolin den CFTR und den NKCC1 aktiviert, wobei letzter aufgrund der hochkaliumreichen Superfusionslösungen im *reverse mode*, also als Cl^- Exportmechanismus, arbeitet.

2 Calciumabhängigkeit der Chloridleitfähigkeit

Nachdem Carbachol an muscarinerge Rezeptoren gebunden hat, kommt es zu einem Anstieg des cytoplasmatischen Calciums durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und durch den Calciumeinstrom von extrazellulär (Fischer *et al.* 1992; Frings *et al.* 1999). Wie oben erläutert konnte unter den speziellen Versuchsbedingungen davon ausgegangen werden, dass diese Änderung der Calciumkonzentration direkt den Ausstrom von Chlorid auslöste. Aus den veröffentlichten Daten aus Ussingkammer-Versuchen ist ersichtlich, dass es sich bei dem Carbachol-stimulierten I_{sc} um eine Stilbensensitive Chloridleitfähigkeit handelte, die durch Ionomycin aktiviert werden konnte (Schultheiss *et al.* 2005).

Beides konnte ich in den Imaging-Versuchen bestätigen. Allerdings zeigte im Gegensatz zu der Arbeit von Schultheiss *et al.*, in der DIDS weniger effektiv war als SITS, bei den von mir durchgeführten Versuchen an isolierten Krypten gerade DIDS die größere Wirksamkeit. Diese Diskrepanz hängt vermutlich mit der unterschiedlichen Struktur der beiden Stilbene zusammen. Während SITS eine 4-Acetamid-Gruppe besitzt, findet sich am lipophileren DIDS an gleicher Stelle eine 4-Isothiocyanat-Gruppe. Möglicherweise stellt die in der Ussing-Kammer intakte Schleimschicht für DIDS ein effizientes Diffusionshindernis dar, wodurch es die Chloridkanäle an der apikalen Membran nicht erreicht.

Weiterhin gelten die Stilbene DIDS und SITS auch als Inhibitoren des

$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers, der an der apikalen und der basolateralen Membran des distalen Kolons arbeitet (Binder *et al.* 1991; Ikuma *et al.* 2003). Dieser benötigt HCO_3^- als Substrat zum Austausch gegen Chlorid. Da HCO_3^- extrazellulär nicht vorlag, konnte der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen nicht aktiv werden. Dies indiziert, dass lediglich CaCCs in meinen Versuchen gehemmt wurden.

In Abbildung III.3 ist noch ein weiterer Effekt von DIDS zu erkennen. Um den eigentlichen Versuchsablauf verfolgen zu können, subtrahierte ich den Wert der Eigenfluoreszenz von DIDS von den Originalmessungen. Das Resultat ist in Bild 3) der Abbildung III.3 zu sehen. Es zeigt sich deutlich, dass direkt nach der Applikation von DIDS die Fluoreszenzintensität von MEQ sinkt. Das Stilben blockiert also anscheinend bereits hier den Transport von Chlorid über einen CaCC. Bei den Originalkurven von SITS ist der gleiche Effekt zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

3 Kryptenachse

Charakteristisch für das Kolonepithel ist der Vorgang der Zellreifung. Im Fundus der Krypten liegen proliferierende Stammzellen. Die von ihnen abstammenden Tochterzellen wandern entlang der Kryptenachse zur Oberfläche und differenzieren währenddessen zu reifen Zellen. An der Oberfläche lockert sich die Verbindung zwischen Basallamina und Zelle und die Zellen schilfern ins Darmlumen ab (Lipkin 1985; Potten *et al.* 1997).

Während dieser Differenzierungsphase ändern die Zellen ihre Haupttransporttätigkeit für Elektrolyte. Während die Enterozyten im Kryptenfundus NaCl vor allem sezernieren, wechseln sie im Laufe ihrer Wanderung die Transportrichtung. An der Oberfläche angekommen resorbieren sie hauptsächlich NaCl. Es handelt sich dabei jedoch nicht um

eine strikte Aufgabeneinteilung. Auch die Funduszellen sind in der Lage Elektrolyte zu resorbieren, und die Oberflächenzellen können durch geeignete Stimuli zur Sekretion angeregt werden (Köckerling & Fromm 1993; Singh *et al.* 1995; Greger *et al.* 1997).

Um der Frage nach zu gehen, ob dieser Prozess der Zelldifferenzierung zu Unterschieden in der Zellantworten nach Stimulation durch Carbachol führt, wurden in einer Versuchsreihe Zellen der unterschiedlichen Achsenabschnitte Fundus, Mitte und Oberfläche zeitgleich gemessen. Der Vergleich der $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ der jeweiligen Abschnitte miteinander zeigte, dass kein Unterschied in der Sekretionsleitung besteht (siehe Abb.III.5). Somit scheint der Differenzierungsgrad der Zelle keinen Einfluss auf die CaCC-vermittelte Chloridleitfähigkeit zu haben.

4 Signalkaskade

Über die Aktivierung Ca^{2+} /CaM-Komplex-abhängiger Enzyme ist Calmodulin in viele zelluläre Mechanismen einbezogen. Eines dieser Enzyme, die CaMKII (Calmodulinkinase II), ist in der Lage CaCCs zu aktivieren. Dies wurde bislang unter anderem für Epithelien der Atemwege des Menschen beschrieben (Übersicht siehe: Hartzell *et al.* 2005). Die Blockade von Calmodulin mittels Calmidazolium hatte jedoch keinerlei Einfluss auf das durch Carbachol hervorgerufene $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ (siehe Abb. III.8). Somit scheidet dieser Weg als Möglichkeit der Signalweiterleitung aus.

Im nächsten Schritt wurde die Phospholipase C-Kaskade genauer untersucht. Denn 2002 veröffentlichten Kilic und Fitz Ergebnisse, wonach die Aktivierung von G-Proteinen in HTC Hepatoma Zellen via PLC-IP₃- Ca^{2+} -Signalweg in der Stimulation von CaCC-Kanälen mündete (Kilic & Fitz 2002). Somit erschien der Phospholipase C-Weg als aussichtsreicher Kandidat.

Mittels Blocker, die an unterschiedlichen Stufen der Kaskade wirken, sollte die Carbacholantwort gehemmt werden. Zusätzlich versuchte ich mit dem DAG-Analogon OAG eine Chloridsekretion zu stimulieren. Die Hemmung der Phospholipase C durch U-73122 hatte keinen Einfluss auf die Reaktion der Zelle auf Carbacholstimulation (siehe Abb. III.8), und mit OAG konnte keine Änderung der $[Cl^-]_i$ ausgelöst werden. Im direkten Kontrast dazu steht die Beobachtung, dass Staurosporin das Carbachol-induzierte $\Delta[Cl^-]_i$ signifikant reduzierte. Diese widersprüchlichen Resultate forderten weitere Untersuchungen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die G-Protein-Untereinheit $G\beta\gamma$ die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIK3) direkt aktiviert. Die PIK3 wiederum phosphoryliert Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat und mobilisiert darüber die atypische PKC ζ (Übersicht siehe: Landry *et al.* 2006). Gö 6983, ein Blocker der cPKCs und der aPKC ζ (Chow *et al.* 2000), konnte den Efflux von Chlorid jedoch nicht hemmen (siehe Abbildung III.8), womit deren Beteiligung am Signalweg ausscheidet.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die klassischen Signalkaskaden nicht zur Aktivierung des CaCCs führen. Die Untersuchung alternativer Wege der Signalweiterleitung stellten daher den Gegenstand der weiteren Versuchsreihen dar.

5 Stickstoffmonoxid als second messenger

Stickstoffmonoxid ist ein freies Radikal, gebildet von NO-Synthasen aus molekularem Sauerstoff und L-Arginin unter Beteiligung von NADPH. Die NOS werden in drei Isoformen gegliedert, nNOS (neuronal Form, Typ I, NOS-I oder NOS-1), i-NOS (induzierbare Form, Typ 2, NOS-II, NOS-2) und e-NOS (in vaskular endothelialen Zellen, Typ 3, NOS-III, NOS-3). Sie sind Produkte

unterschiedlicher Gene mit verschiedenen Lokalisationen, Regulationsmechanismen, katalytischen Eigenschaften und unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Blockern. Weiterhin wird die Gruppe der konstitutiven, calciumabhängigen NOS (n-NOS und e-NOS) von der induzierbaren, calciumunabhängigen i-NOS abgegrenzt (Übersicht siehe: Alderton *et al.* 2001).

Die Aktivierung der konstitutiven NOS erfolgt z.B. nach Bindung von Mediatoren an ionotrope Rezeptoren. Kanäle öffnen sich und Calcium strömt in die Zelle ein. Dies kann durch eine Calcium-induzierte Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum verstärkt werden. Calcium verbindet sich mit Calmodulin zu dem Ca^{2+} /CaM-Komplex, der die konstitutiven NOS aktiviert.

Ein weiterer Signalweg läuft über einen G-Protein-gekoppelten metabotropen Rezeptor. Wird dieser aktiviert, führt er zur Dissoziation des G-Proteins. Sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit binden an die Membran und aktivieren dort verschiedenste Enzyme, unter anderem membranständige NOS und die Phospholipase A und C β (PLA₂ und PLC β). Das Substrat der PLC β ist Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat (PIP₂). PIP₂ wird zu IP₃ und DAG gespalten. IP₃ bindet an das Endoplasmatische Retikulum und führt, ebenso wie einströmendes Calcium, zur Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Es bildet sich wiederum der Ca^{2+} /CaM-Komplex und cNOS werden aktiviert.

Bei der induzierbaren NOS ging man ursprünglich davon aus, dass sie calciumunabhängig ist und ausschließlich nach Anregung spezifischer Rezeptoren, Tyrosinkinasen, durch Endotoxine oder Cytokine exprimiert wird. Zu den durch Tyrosinkinasen angesprochenen Proteinen gehören die „signal transducers activating transcription“ (STAT). Diese diffundieren in den Zellkern und aktivieren Transkriptionsfaktoren via Phosphorylierung. Die

Transkriptionsfaktoren lösen die i-NOS-Genexpression aus und nach ca. zwei Stunden beginnt die Synthese von i-NOS (Arzumanian *et al.* 2003). Anfang der Neunziger gelang jedoch in einigen Studien der Nachweis, dass auch induzierbare NOS calciumabhängig sind (Knowles & Moncada 1994). So war es zum Beispiel möglich *in vitro* mit Interleukin-1 und Endotoxinen eine calciumabhängige NO-Synthase in artikulären Chondrocyten zu induzieren (Palmer *et al.* 1992). Auch in der microsomalen Fraktion von aktivierten Makrophagen von Kaninchen wurde eine calciumabhängige i-NOS neben der bereits bekannten calciumunabhängigen i-NOS gefunden (Hiki *et al.* 1991). Weiterhin konnte im Intestinum der Ratte *in vivo* eine calciumabhängige i-NOS durch Endotoxine stimuliert werden (Salter *et al.* 1991).

In meinen Untersuchungen zeigte sich, dass über den NO-Donor Nitroprussid eine dem Carbachol-Effekt ähnliche Änderung der $[Cl^-]_i$ ausgelöst werden konnte. Außerdem hemmte der unspezifische NOS-Blocker L-NMMA den Carbachol-stimulierten Chloridefflux. Dies konnte jedoch mit L-NNA nicht bestätigt werden. Möglicherweise hängt dies mit der wesentlich schwächeren Hemmwirkung von L-NNA auf die induzierbare NOS zusammen (Dwyer *et al.* 1991).

Mittels immunhistochemischem Nachweis konnten alle drei NOS-Isoformen im Kolongewebe der Ratte lokalisiert werden, wobei hier die neuronale Form und die induzierbare Form wesentlich präsenter zu sein scheinen als die endotheliale Form (siehe Abbildungen III.9-11). Die n-NOS und die i-NOS sind entlang der gesamten Kryptenachse zu finden, wobei sich die n-NOS im Bereich des Oberflächenepithels und in der apikalen Membran konzentriert. Die Signale der i-NOS sind ebenfalls in der apikalen Zellmembran und weiträumig im Zytoplasma zu erkennen. Im Vergleich dazu beschränkt sich die e-NOS mehr auf das Oberflächenepithel.

Das Vorkommen aller drei NOS-Formen im Kolonepithel verwunderte

zuerst, deckt sich aber mit Befunden aus der Literatur. Auch von anderen Epithelien weiß man, dass sie eine der drei NOS-Isoformen oder Kombinationen aus diesen exprimieren (Garcia-Vitoria *et al.* 2000; Roberts *et al.* 2001; Zhan *et al.* 2003; Puhakka *et al.* 2006). Eine konstitutive Expression der i-NOS ist auch im humanen Kolon beschrieben und wird mit der beständigen Konfrontation des Organs mit bakteriellen Lipopolysacchariden in Zusammenhang gebracht (Roberts *et al.* 2001).

Die gleichmäßige Verteilung der n-NOS und der i-NOS über die gesamte Kryptenachse korreliert mit dem Befund, dass es keinen Unterschied in der Amplitude der $\Delta [Cl^-]_i$ zwischen der Kryptenoberfläche, dem mittleren Bereich und dem Fundus gibt. Weiterhin stützt die deutliche Expression der i-NOS die durch die Blocker-Versuche vermutete Beteiligung der i-NOS an der Signalkaskade.

Inwiefern die einzelnen NOS-Formen beteiligt sind und in welcher Weise die NOS an der Aktivierung des CaCCs mitwirken, konnte mit den durchgeführten Versuchen nicht geklärt werden.

6 Das Cytoskelett

Wie die oben diskutierten Befunde zeigen, scheinen die NOS eine wichtige Rolle zur Aktivierung des CaCCs zu spielen. Es stellt sich die Frage, über welchen Weg Calcium die NOS stimulieren kann. In diesem Zusammenhang verfestigte sich in den letzten Jahren zunehmend ein interessanter Erklärungsansatz, wonach die NOS mit dem Cytoskelett interagieren.

Das Cytoskelett setzt sich aus Mikrofilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli zusammen. Alle diese Strukturen nehmen eine Vielzahl von Aufgaben im Cytoplasma dar. So stützen sie nicht nur die Zellmembran, sondern sind auch am Transport von Vesikeln beteiligt und interagieren mit

der Zellmembran und darin verankerten Strukturen. Dazu gehören nicht zuletzt Kanäle, die über das Cytoskelett beeinflusst werden. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Chloridkanals ClC-2 durch die Zerstörung von Mikrofilamenten mittels Cytochalasin D und Latrunculin deutlich gesteigert wird (Ahmed *et al.* 2000). Auch gibt es Hinweise, dass das Actinskelett bei der Regulation des CFTR eine Rolle spielt (Cantiello 1996). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass durch Versteifung des Cytoskeletts der speicherabhängige Calciumeinstrom verhindert wird (Rosado & Sage 2000).

Zu den bezüglich der NOS bisher veröffentlichten Studien gehört der Befund, dass das F-Actin stabilisierende Jasplakinolide die i-NOS-Expression unterdrückt (Zeng *et al.* 2001). Im Jahr darauf konnte durch konfokal-mikroskopische Aufnahmen die Colokalisation zwischen i-NOS und Actinfilamenten gezeigt werden (Glynn *et al.* 2002). Auch die e-NOS weist eine Colokation sowohl mit dem F-Actin, als auch mit dem G-Actin auf (Kondrikov *et al.* 2006). Zusätzlich wird die Produktion von NO durch die e-NOS scheinbar über Mikrotubuli reguliert (Su *et al.* 2002).

Der Einsatz verschiedener cytoskelettaktiver Substanzen in der Ussing-Kammer und der Imaging-Technik sollte Aufschluss darüber geben, ob es einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des CaCCs und dem Cytoskelett gibt. Als mikrotubulizerstörende Substanzen wurden Colchicin und Nocodazol verwendet. Beide reduzierten das $\Delta [Cl^-]_i$, ausgelöst durch Carbachol, signifikant. Es verblieb lediglich eine Differenz, die dem Wert der zeitabhängigen Kontrolle entspricht (siehe Tab. III.2-4).

Cytochalasin D und Jasplakinolide wirken beide an Actinfilamenten. Während erstes zur Depolymerisation der Filamente führt, wird dies von letzterem verhindert. Dieser Unterschied in den Wirkmechanismen spiegelte sich in den Versuchsergebnissen wider. Cytochalasin D beeinflusste die

Änderung der $[Cl^-]_i$ nicht signifikant. Die Versteifung des Cytoskeletts hingegen verminderte die Änderung von $[Cl^-]_i$ auf das Niveau der zeitabhängigen Kontrolle (siehe Tab. III.4). Dementsprechend scheint ein intaktes Actincytoskelett notwendig für die Signaltransduktion zu sein.

In Abbildung III.12 ist neben der Originalkurve des Ussingkammer-Versuches auch eine Originalkurve der Carbacholstimulation ohne Einsatz eines Inhibitors dargestellt. Im Gegensatz zu den Imagingversuchen, wo ein langanhaltender Effekt zu beobachten ist, zeigt sich hier ein transienter Anstieg des I_{sc} , gefolgt von einer langanhaltenden Hemmphase. Diese kann über Befunde erklärt werden, die 2001 veröffentlicht wurden. Hier zeigte sich, dass der Forskolin-induzierte Strom durch Applikation von Carbachol an intaktem Gewebe gehemmt wurde (Schultheiss *et al.* 2001). Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsbedingungen indiziert das Ergebnis die Inhibierung apikaler Chloridkanäle. Dies lässt vermuten, dass durch Carbachol der Chloridausstrom über CFTR-Kanäle blockiert wird.

Insgesamt zeigen die Versuchsergebnisse somit, dass das Cytoskelett regulierend in den Carbachol-induzierten Chloridausstrom eingreift. Dabei sind sowohl die Actinfilamente als auch die Mikrotubuli beteiligt. Rückschlüsse auf die Kopplung der Strukturen des Cytoskeletts mit den NOS können aus diesen Ergebnissen nicht gezogen werden. Auch bezüglich der Art des Zusammenspiels zwischen dem Anstieg des cytoplasmatischen Calciums und der Aktion des Cytoskeletts kann keine Aussage getroffen werden.

7 Zellmodell

Fasst man die gewonnen Ergebnisse zusammen, lässt sich folgendes vorläufiges Zellmodell erstellen:

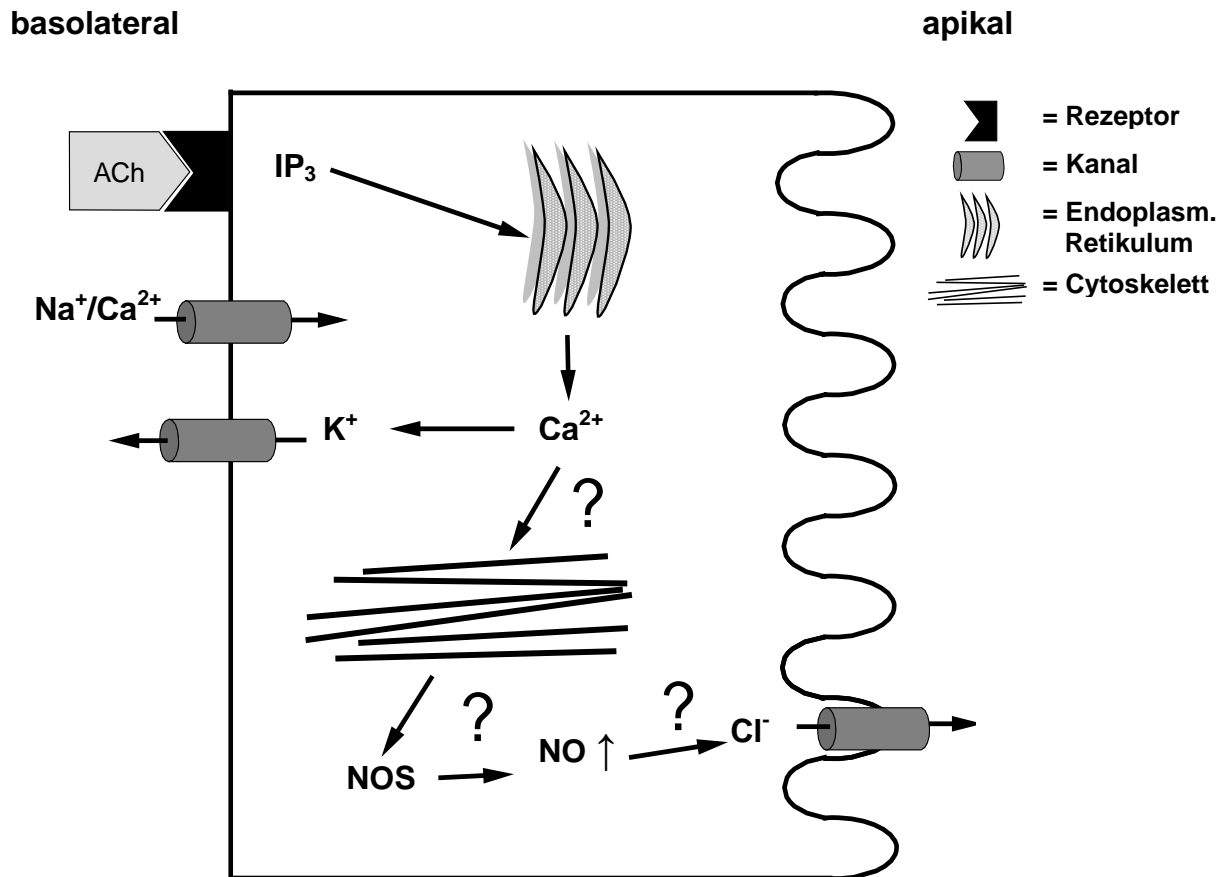


Abb. IV.1: Zellmodell.

Nach Bindung von Carbachol beziehungsweise seines natürlichen Pendant Acetylcholin an einen muscarinergen Rezeptor kommt es IP_3 vermittelt zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Calcium aktiviert Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle und Kalium strömt aus der Zelle heraus. Zusätzlich interagiert das Calcium mit dem Cytoskelett. Dieses wiederum aktiviert Nitromonoxidsynthasen und NO wird synthetisiert. NO führt schließlich zur Sekretion von Chlorid über CaCCs.

V Zusammenfassung

Calciumaktivierte Chloridkanäle (CaCC) spielen in vielen Epithelien eine wichtige Rolle. Nachdem ein CaCC auch am Kolonepithel der Ratte funktionell nachgewiesen werden konnte, war es Ziel dieser Arbeit diesen genauer zu untersuchen. Dabei sollte überprüft werden, wie stark die über den CaCC vermittelte Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration $\Delta [\text{Cl}^-]_i$ ist und ob sich die Amplitude über die Kryptenachse verändert. Außerdem sollte der Weg der Signaltransduktion ermittelt werden.

Unter depolarisierten Bedingungen und nach Anlegen eines chemischen Gradienten für Chlorid war es möglich durch Stimulation mit Carbachol eine CaCC getragene Absenkung der $[\text{Cl}^-]_i$ mittels Imaging-Technik zu messen. Dazu wurde der halogenidsensitive Farbstoff MEQ verwendet. Der Chloridausstrom war stilbensensitiv und konnte mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin nachgeahmt werden. Der Differenzierungsgrad der Epithelzellen spiegelt sich in der Amplitude der Carbacholantwort nicht wider.

Die Signalweiterleitung wird nicht von den klassischen Calcium-assoziierten Kaskaden vorgenommen. Vielmehr müssen alternative Signalwege eine Rolle spielen. Anscheinend ist NO als second messenger in diesen Signalweg einbezogen, da über den NO-Donor Nitroprussid eine dem Carbacholeffekt ähnlich Zellantwort ausgelöst werden konnte. Zusätzlich hemmte L-NMMA, ein Blocker der NOS-Subtypen, die Carbachol-induzierte Chloridsekretion. L-NNA, ebenfalls ein Inhibitor von NOS konnte die Carbacholantwort der Krypten nicht blockieren. Da L-NNA eine deutlich schwächere Wirksamkeit auf die i-NOS besitzt, indiziert dies eine Beteiligung dieses NOS-Subtyps. Mittels immunhistochemischer Methodik wurde das Verteilungsmuster der NOS-Subtypen im Kolonepithel untersucht. Hierbei zeigte sich, dass vor allem die i-NOS und die n-NOS sehr präsent und entlang der gesamten Kryptenachse zu finden sind. Die e-NOS hingegen wird

wesentlich schwächer exprimiert und konzentriert sich auf die Oberflächenregion.

Als Vermittler zwischen dem Anstieg des cytoplasmatischen Calciums und den NOS fungiert möglicherweise das Cytoskelett. Nocodazol und Colchicin zerstören die Mikrotubuli und reduzierten den Carbachol-induzierten Chloridefflux signifikant. Jasplakinolide, welches das Actinskelett versteift, indem es die Depolymerisation des F-Actins verhindert, hemmte ebenfalls den Chloridefflux. Somit scheint sowohl ein intaktes Netzwerk der Mikrotubuli, als auch ein intaktes Actincytoskelett zu Aktivierung des CaCCs erforderlich zu sein.

VI Summary

Ca^{2+} -activated Cl^- channels (CaCCs) play an important role in numerous epithelia. As the existence of a CaCC has been shown functionally at the colonic epithelium of the rat, the aim of this study was to characterize its role during Ca^{2+} -dependent Cl^- secretion evoked by the stable acetylcholine derivative, carbachol.

With the imaging technique using the halide-sensitive dye, MEQ, it was possible to measure a carbachol-stimulated decrease in intracellular Cl^- concentration ($\Delta [\text{Cl}^-]_i$) under depolarized conditions in the presence of a chemical gradient for Cl^- . The efflux of Cl^- was sensitive against stilbenes and could be mimicked by the calcium ionophore, ionomycin. The degree of cellular differentiation did not affect the amplitude of the carbachol response.

Classical Ca^{2+} involving cascades do not transduce the signal. Rather alternative pathways have to play a role. Apparently, NO is involved as a second messenger as sodium nitroprusside, a NO donor, mimicked the carbachol response. In addition, L-NMMA, a blocker of the NO-synthases (NOS) inhibited the carbachol response. Another blocker of NOS, L-NNA, was ineffective. Since L-NNA is a only poor blocker of the i-NOS, this result suggests a participation of this NOS-isoform in the signaling cascade. The pattern of distribution of the three NOS-isoforms was examined by immunohistochemistry. It was shown that the i-NOS and the e-NOS are present all over the crypt axis. In contrast, the n-NOS is expressed in a weaker manner and is concentrated on the top of the crypt.

Intermediary between the increase of the intracellular Ca^{2+} concentration and the NOS may be the cytoskeleton. Both nocodazol and colchicine reduced the carbachol-induced Cl^- efflux significantly. Jasplakinolide, which stiffens the cytoskeleton by inhibiting the depolymerisation of the F-actin, also blocked the Cl^- -efflux. Thus, for activating

the CaCC both a functional microtubule network as well as a functional actin cytoskeleton seem to be required.

VII Abbildungsverzeichnis

Abb. I.1: Schematische Darstellung der Kolonwand.....	3
Abb. I.2: Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Resorption von Natrium, Kalium und Chlorid.	5
Abb. I.3: Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Sekretion von Chlorid.....	6
Abb. I.4: Calcium-vermittelte Chloridsekretion nach muscarinerger Stimulation.....	10
Abb. I.5: Derzeit akzeptierte Topologie des CFTR.	13
Abb. II.1: Einzelne Krypte, isoliert aus dem Kolon einer Ratte.....	26
Abb. II.2: Strukturformel von MEQ und DiH-MEQ.....	28
Abb. II.3: Fluoreszenzeigenschaften von MEQ (durchgehende Linien) und DiH-MEQ (gestrichelte Linie, modifiziert nach Biwersi & Verkman 1991).....	31
Abb. II.4: Tributylzinn-Chlorid (TBT).	33
Abb. II.5: Nigericin.	34
Abb. II.6: Valinomycin.	36
Abb. II.7: Schematische Darstellung des Imaging-Setups.	37
Abb. II.8: Falschfarbendarstellung zweier Krypten nach Aufladung mit MEQ.....	41
Abb. II.9: a) direkter Nachweis; b) indirekter Nachweis.	44
Abb. II.10: Schema einer modifizierten Ussingkammer.	50
Abb. II.11: Elektrisches Schaltkreismodell.	51
Abb. II.12: a) Open-circuit-modus; b) Voltage-clamp-Modus.	53
Abb. III.1: Carbachol-induzierte Erhöhung des MEQ-Signals.....	57
Abb. III.2: Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration durch Ca^{2+} -abhängige Sekretagoge.....	58
Abb. III.3: Vollständige Hemmung der Carbacholantwort durch DIDS.....	60
Abb. III.4: Hemmung des Carbacholeffekts durch SITS und DIDS.....	61
Abb. III.5 Vergleich der Änderung von $[\text{Cl}^-]_i$ entlang der Kryptenachse.	62
Abb. III.6: Forskolin induzierte Änderung der MEQ-Fluoreszenzintensität.	63
Abb. III.7: Forskolin-induzierter Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration.....	65
Abb. III.8: Wirkung von Hemmstoffen der klassischen Ca^{2+} -Signaltransduktionswege auf den Carbacholeffekt.	67
Abb. III.9: n-NOS-Signal im Kolonepithel.....	71
Abb. III.10: i-NOS-Signal im Kolonepithel.....	72
Abb. III.11: e-NOS-Signal im Kolonepithel.....	73
Abb. III.12: Stimulation eines Cl^- -Stroms durch die apikale Membran.....	76
Abb. IV.1: Zellmodell.	90

VIII Tabellenverzeichnis

Tab. II.1: Wirkungsweise und Konzentrationen der eingesetzten Stimulantien.	41
Tab. II.2: Wirkungsweise und Konzentrationen der verwendeten Antagonisten.	42
Tab. II.3.: Verwendete Primärantikörper.....	47
Tab. II.4.: Verwendeter Sekundärantikörper.....	47
Tab. III.1: Auswirkung der Inhibitoren der NOS auf die Carbacholantwort.	69
Tab. III.2: Wirkung Mikrotubuli-depolymerisierender Substanzen in Imaging-Experimenten.	75
Tab. III.3: Wirkung von Colchicin in der Ussingkammer.	77
Tab. III.4: F-Actin wirksame Cytoskelett-Toxine in Imaging-Experimenten.....	78

IX Literaturverzeichnis

- Ahmed, N., Ramjeesingh, M., Wong, S., Varga, A., Garami, E., Bear, C.E.,** (2000) Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton. *Biochem J*, 352, 789-794.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G.,** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357, 593-615.
- Anderson, M.P., Welsh, M.J.,** (1991) Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6003-6007.
- Andreu, J.M., Perez-Ramirez, B., Gorbunoff, M.J., Ayala, D., Timasheff, S.N.,** (1998) Role of the colchicine ring A and its methoxy groups in the binding to tubulin and microtubule inhibition. *Biochemistry*, 37, 8356-8368.
- Arzumanian, V., Stankevicius, E., Laukeviciene, A., Kevelaitis, E.,** (2003) [Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells]. *Medicina (Kaunas)*, 39, 535-541.
- Bajnath, R.B., Dekker, K., De Jonge, H.R., Groot, J.A.,** (1995) Chloride secretion induced by phorbol dibutyrate and forskolin in the human colonic carcinoma cell line HT-29Cl.19A is regulated by different mechanisms. *Pflugers Arch*, 430, 705-712.
- Barrett, K.E., Keely, S.J.,** (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol*, 62, 535-572.
- Binder, H.J., Sandle, G., Rajendran, V.M.,** (1991) Colonic fluid and electrolyte transport in health and disease. In: *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology, and Disease* (Ed. by S.F. Phillips, J.H. Hemberton, R.G. Shorter), 141-168. Raven Press, New York.
- Biwersi, J., Verkman, A.S.,** (1991) Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride. *Biochemistry*, 30, 7879-7883.
- Bleich, M., Riedemann, N., Warth, R., Kerstan, D., Leipziger, J., Hor, M., Driessche, W.V., Greger, R.,** (1996) Ca^{2+} regulated K^{+} and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch*, 432, 1011-1022.
- Böhme, M., Diener, M., Rummel, W.,** (1991) Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflugers Arch*, 419, 144-151.
- Bormann, J., Hamill, O.P., Sakmann, B.,** (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol*, 385, 243-286.
- Boyd, A.E., 3rd, Bolton, W.E., Brinkley, B.R.,** (1982) Microtubules and beta cell function: effect of colchicine on microtubules and insulin secretion in vitro by mouse beta cells. *J Cell Biol*, 92, 425-434.
- Boyer, I.J.,** (1989) Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, 55, 253-298.

-
- Brose, N., Betz, A., Wegmeyer, H.,** (2004) Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 328-340.
- Bubb, M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L., Korn, E.D.,** (1994) Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem*, 269, 14869-14871.
- Bubb, M.R., Spector, I., Beyer, B.B., Fosen, K.M.,** (2000) Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem*, 275, 5163-5170.
- Cantiello, H.F.,** (1996) Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Physiol*, 81, 505-514.
- Chao, A.C., Dix, J.A., Sellers, M.C., Verkman, A.S.,** (1989) Fluorescence measurement of chloride transport in monolayer cultured cells. Mechanisms of chloride transport in fibroblasts. *Biophys J*, 56, 1071-1081.
- Choi, M.S., Cooke, B.A.,** (1992) Calmidazolium is a potent stimulator of steroidogenesis via mechanisms not involving cyclic AMP, calcium or protein synthesis. *Biochem J*, 281 (Pt 1), 291-296.
- Chow, J.Y., Uribe, J.M., Barrett, K.E.,** (2000) A role for protein kinase cepsilon in the inhibitory effect of epidermal growth factor on calcium-stimulated chloride secretion in human colonic epithelial cells. *J Biol Chem*, 275, 21169-21176.
- Chow, S.C., Orrenius, S.,** (1994) Rapid cytoskeleton modification in thymocytes induced by the immunotoxicant tributyltin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 127, 19-26.
- Christensen, J.,** (1991) Gross and microscopic anatomy of the large Intestine. In: *The Large Intestine: physiology, pathophysiology, and disease* (Ed. by S.F. Phillips, J.H. Hemberton, R.G. Shorter), 13-35. Raven Press, New York.
- Cooke, H.J.,** (1991) Regulation of the colonic transport by the autonomic nervous system. In: *The Large Intestine: Physiology, pathophysiology, and disease* (Ed. by S.F. Phillips, J.H. Hemberton, R.G. Shorter), 169-179. Rave Press, New York.
- Coons, A.H.,** (1958) Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods*, 1, 399-422.
- Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M., Hannun, Y.A.,** (1991) Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *Faseb J*, 5, 2068-2077.
- Diener, M., Egleme, C., Rummel, W.,** (1991) Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa. *Eur J Pharmacol*, 200, 267-276.
- Diener, M., Hug, F., Strabel, D., Scharrer, E.,** (1996) Cyclic AMP-dependent regulation of K⁺ transport in the rat distal colon. *Br J Pharmacol*, 118, 1477-1487.

-
- Diener, M., Hug, F., Strabel, D., Scharrer, E.,** (1996) Cyclic AMP-dependent regulation of K^+ transport in the rat distal colon. *Br J Pharmacol*, 118, 1477-1487.
- Diener, M., Nobles, M., Rummel, W.,** (1992) Activation of basolateral Cl^- channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease. *Pflugers Arch*, 421, 530-538.
- Diener, M., Rummel, W.,** (1990) Distension-induced secretion in the rat colon: mediation by prostaglandins and submucosal neurons. *Eur J Pharmacol*, 178, 47-57.
- Diener, M., Rummel, W., Mestres, P., Lindemann, B.,** (1989) Single chloride channels in colon mucosa and isolated colonic enterocytes of the rat. *J Membr Biol*, 108, 21-30.
- Dwyer, M.A., Bredt, D.S., Snyder, S.H.,** (1991) Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-NG-nitroarginine in brain in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 176, 1136-1141.
- Eggermont, J.,** (2004) Calcium-activated chloride channels: (un)known, (un)loved? *Proc Am Thorac Soc*, 1, 22-27.
- Fent, K., Woodin, B.R., Stegeman, J.J.,** (1998) Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 121, 277-288.
- Fischer, H., Illek, B., Negulescu, P.A., Clauss, W., Machen, T.E.,** (1992) Carbachol-activated calcium entry into HT-29 cells is regulated by both membrane potential and cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1438-1442.
- Fischer, H., Illek, B., Negulescu, P.A., Clauss, W., Machen, T.E.,** (1992) Carbachol-activated calcium entry into HT-29 cells is regulated by both membrane potential and cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1438-1442.
- Fischer, T.H., Campbell, K.P., White, G.C., 2nd,** (1987) An investigation of functional similarities between the sarcoplasmic reticulum and platelet calcium-dependent adenosinetriphosphatases with the inhibitors quercetin and calmidazolium. *Biochemistry*, 26, 8024-8030.
- Frings, M., Schultheiss, G., Diener, M.,** (1999) Electrogenic Ca^{2+} entry in the rat colonic epithelium. *Pflugers Arch*, 439, 39-48.
- Fuller, C.M., Benos, D.J.,** (2000) Ca^{2+} -Activated Cl^- Channels: A newly emerging anion transport family. *News Physiol Sci*, 15, 165-171.
- Garcia-Vitoria, M., Garcia-Corchon, C., Rodriguez, J.A., Garcia-Amigot, F., Burrell, M.A.,** (2000) Expression of neuronal nitric oxide synthase in several cell types of the rat gastric epithelium. *J Histochem Cytochem*, 48, 1111-1120.
- Gietzen, K., Sadorf, I., Bader, H.,** (1982) A model for the regulation of the calmodulin-dependent enzymes erythrocyte Ca^{2+} -transport ATPase and brain phosphodiesterase by activators and inhibitors. *Biochem J*, 207, 541-548.

- Glynn, P.A., Darling, K.E., Picot, J., Evans, T.J.,** (2002) Epithelial inducible nitric-oxide synthase is an apical EBP50-binding protein that directs vectorial nitric oxide output. *J Biol Chem*, 277, 33132-33138.
- Greger, R.,** (2000) Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol*, 62, 467-491.
- Greger, R., Bleich, M., Leipziger, J., Ecke, D., Mall, M., Kunzelmann, K.,** (1997) Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol Sci*, 12, 62-66.
- Haas, M., Forbush, B., 3rd,** (2000) The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol*, 62, 515-534.
- Haggie, P.M., Stanton, B.A., Verkman, A.S.,** (2004) Increased diffusional mobility of CFTR at the plasma membrane after deletion of its C-terminal PDZ binding motif. *J Biol Chem*, 279, 5494-5500.
- Hagiwara, S., Takahashi, K.,** (1974) Mechanism of anion permeation through the muscle fibre membrane of an elasmobranch fish, *Taeniura lymma*. *J Physiol*, 238, 109-127.
- Halm, D.R., Frizzell, R.A.,** (1992) Anion permeation in an apical membrane chloride channel of a secretory epithelial cell. *J Gen Physiol*, 99, 339-366.
- Harlow, E.,** (1988) *Antibodies- A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Harris, E.J.,** (1958) Anion interaction in frog muscle. *J Physiol*, 141, 351-365.
- Hartzell, C., Putzier, I., Arreola, J.,** (2005) Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol*, 67, 719-758.
- Hiki, K., Yui, Y., Hattori, R., Eizawa, H., Kosuga, K., Kawai, C.,** (1991) Cytosolic and membrane-bound nitric oxide synthase. *Jpn J Pharmacol*, 56, 217-220.
- Ikuma, M., Geibel, J., Binder, H.J., Rajendran, V.M.,** (2003) Characterization of Cl-HCO₃ exchange in basolateral membrane of rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285, C912-921.
- Ishida, A., Shigeri, Y., Taniguchi, T., Kameshita, I.,** (2003) Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther*, 100, 291-305.
- Ivanov, V.T., Laine, I.A., Abdulaev, N.D., Senyavina, L.B., Popov, E.M.,** (1969) The physicochemical basis of the functioning of biological membranes: the conformation of valinomycin and its K⁺ complex in solution. *Biochem Biophys Res Commun*, 34, 803-811.
- Janmey, P.A.,** (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, 78, 763-781.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A.A.,** (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*, 82, 503-568.
- Jordan, M.A., Thrower, D., Wilson, L.,** (1992) Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci*, 102 (Pt 3), 401-416.

- Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T., Nishizuka, Y.,** (1983) Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J Biol Chem*, 258, 6701-6704.
- Kaplan, M.R., Mount, D.B., Delpire, E.,** (1996) Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu Rev Physiol*, 58, 649-668.
- Kilic, G., Fitz, J.G.,** (2002) Heterotrimeric G-proteins activate Cl⁻ channels through stimulation of a cyclooxygenase-dependent pathway in a model liver cell line. *J Biol Chem*, 277, 11721-11727.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I.,** (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett*, 140-141, 63-74.
- Knowles, R.G., Moncada, S.,** (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 (Pt 2), 249-258.
- Köckerling, A., Fromm, M.,** (1993) Origin of cAMP-dependent Cl⁻ secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am J Physiol*, 264, C1294-1301.
- Köckerling, A., Sorgenfrei, D., Fromm, M.,** (1993) Electrogenic Na⁺ absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study. *Am J Physiol*, 264, C1285-1293.
- Kondrikov, D., Han, H.R., Block, E.R., Su, Y.,** (2006) Growth and density-dependent regulation of NO synthase by the actin cytoskeleton in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290, L41-50.
- König, H.E., Liebig, H.-G.,** (1999) Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). In: *Anatomie der Haussäugetiere*, 2 (Ed. by H.E. König, H.-G. Liebig), 57-68. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Kreutter, D., Caldwell, A.B., Morin, M.J.,** (1985) Dissociation of protein kinase C activation from phorbol ester-induced maturation of HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem*, 260, 5979-5984.
- Kubista, M., Akerman, B., Norden, B.,** (1987) Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*, 26, 4545-4553.
- Kunzelmann, K., Mall, M.,** (2002) Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, 82, 245-289.
- Landry, Y., Niederhoffer, N., Sick, E., Gies, J.P.,** (2006) Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem*, 13, 51-63.
- Lin, D.C., Tobin, K.D., Grumet, M., Lin, S.,** (1980) Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation. *J Cell Biol*, 84, 455-460.
- Lin, D.C., Tobin, K.D., Grumet, M., Lin, S.,** (1980) Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation. *J Cell Biol*, 84, 455-460.

- Lindström, C.G., Rosengren, J.E., Fork, F.T.**, (1979) Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*, 20, 523-536.
- Linsdell, P.**, (2001) Thiocyanate as a probe of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Can J Physiol Pharmacol*, 79, 573-579.
- Lipkin, M.**, (1985) Growth and development of gastrointestinal cells. *Annu Rev Physiol*, 47, 175-197.
- Lipkin, M.**, (1987) Proliferation and differentiation of normal and diseased gastrointestinal cells. In: *Physiology of the gastrointestinal tract* (Ed. by L.R. Johnson), 255-284. Raven Press, New York.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.**, (2001) *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Malbon, C.C.**, (2005) G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 689-701.
- Mall, M., Bleich, M., Kuehr, J., Brandis, M., Greger, R., Kunzelmann, K.**, (1999) CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol*, 277, G709-716.
- Margolis, R.L., Wilson, L.**, (1977) Addition of colchicine--tubulin complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 3466-3470.
- Markert, T., Vaandrager, A.B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H.R., Jarchau, T., Lohmann, S.M.**, (1995) Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest*, 96, 822-830.
- Miyata, Y., Muto, S., Yanagiba, S., Asano, Y.**, (2000) Extracellular Cl⁻ modulates shrinkage-induced activation of Na⁺/H⁺ exchanger in rat mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278, C1218-1229.
- Moritz, M., Agard, D.A.**, (2001) Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr Opin Struct Biol*, 11, 174-181.
- Musch, A.**, (2004) Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*, 5, 1-9.
- Nilius, B., Droogmans, G.**, (2003) Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand*, 177, 119-147.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U., Flockerzi, V.**, (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem*, 278, 30813-30820.
- Nilius, B., Prenen, J., Szucs, G., Wei, L., Tanzi, F., Voets, T., Droogmans, G.**, (1997) Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol*, 498 (Pt 2), 381-396.
- Nishizuka, Y.**, (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J*, 9, 484-496.

- Palmer, R.M., Andrews, T., Foxwell, N.A., Moncada, S.,** (1992) Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 188, 209-215.
- Parsons, D.S., Paterson, C.R.,** (1965) Fluid and Solute Transport across Fat Colonic Mucosa. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 50, 220-231.
- Pilewski, J.M., Frizzell, R.A.,** (1999) Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev*, 79, S215-255.
- Pinkerton, M., Steinrauf, L.K., Dawkins, P.,** (1969) The molecular structure and some transport properties of valinomycin. *Biochem Biophys Res Commun*, 35, 512-518.
- Potten, C.S., Booth, C., Pritchard, D.M.,** (1997) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol*, 78, 219-243.
- Pressman, B.C.,** (1976) Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem*, 45, 501-530.
- Puhakka, A.R., Harju, T.H., Paakko, P.K., Soini, Y.M., Kinnula, V.L.,** (2006) Nitric oxide synthases are associated with bronchial dysplasia. *Lung Cancer*, 51, 275-282.
- Ran, S., Benos, D.J.,** (1991) Isolation and functional reconstitution of a 38-kDa chloride channel protein from bovine tracheal membranes. *J Biol Chem*, 266, 4782-4788.
- Ran, S., Benos, D.J.,** (1992) Immunopurification and structural analysis of a putative epithelial Cl⁻ channel protein isolated from bovine trachea. *J Biol Chem*, 267, 3618-3625.
- Rebecchi, M.J., Pentyala, S.N.,** (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*, 80, 1291-1335.
- Reif, D.W., McCreedy, S.A.,** (1995) N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch Biochem Biophys*, 320, 170-176.
- Roberts, P.J., Riley, G.P., Morgan, K., Miller, R., Hunter, J.O., Middleton, S.J.,** (2001) The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *J Clin Pathol*, 54, 293-297.
- Robey, R.B., Ruiz, O.S., Baniqued, J., Mahmud, D., Espiritu, D.J., Bernardo, A.A., Arruda, J.A.,** (2001) SFKs, Ras, and the classic MAPK pathway couple muscarinic receptor activation to increased Na-HCO₃ cotransport activity in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, F844-850.
- Rosado, J.A., Sage, S.O.,** (2000) A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. *Trends Cardiovasc Med*, 10, 327-332.
- Salter, M., Knowles, R.G., Moncada, S.,** (1991) Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett*, 291, 145-149.

- Sangan, P., Brill, S.R., Sangan, S., Forbush, B., 3rd, Binder, H.J.,** (2000) Basolateral K-Cl cotransporter regulates colonic potassium absorption in potassium depletion. *J Biol Chem*, 275, 30813-30816.
- Schultheiss, G., Diener, M.,** (1997) Regulation of apical and basolateral K⁺ conductances in rat colon. *Br J Pharmacol*, 122, 87-94.
- Schultheiss, G., Diener, M.,** (1998) Inhibition of a K⁺ conductance by the phosphatase inhibitor calyculin A in rat distal colon. *Eur J Pharmacol*, 349, 89-95.
- Schultheiss, G., Ribeiro, R., Diener, M.,** (2001) Fatty acids inhibit anion secretion in rat colon: apical and basolateral action sites. *Pflugers Arch*, 442, 603-613.
- Schultheiss, G., Ribeiro, R., Schafer, K.H., Diener, M.,** (2003) Activation of apical K⁺ conductances by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon: fast and slow components. *J Membr Biol*, 195, 183-196.
- Schultheiss, G., Seip, G., Kocks, S.L., Diener, M.,** (2002) Ca²⁺-dependent and -independent Cl⁻ secretion stimulated by the nitric oxide donor, GEA 3162, in rat colonic epithelium. *Eur J Pharmacol*, 444, 21-30.
- Schultheiss, G., Siefjediers, A., Diener, M.,** (2005) Muscarinic receptor stimulation activates a Ca²⁺-dependent Cl⁻ conductance in rat distal colon. *J Membr Biol*, 204, 117-127.
- Seamon, K.B., Daly, J.W.,** (1981) Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J Cyclic Nucleotide Res*, 7, 201-224.
- Seeger, R., Krebs, E.G.,** (1995) The MAPK signaling cascade. *Faseb J*, 9, 726-735.
- Sheppard, D.N., Welsh, M.J.,** (1992) Effect of ATP-sensitive K⁺ channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents. *J Gen Physiol*, 100, 573-591.
- Singh, S.K., Binder, H.J., Boron, W.F., Geibel, J.P.,** (1995) Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest*, 96, 2373-2379.
- Snoeij, N.J., Punt, P.M., Penninks, A.H., Seinen, W.,** (1986) Effects of tri-n-butyltin chloride on energy metabolism, macromolecular synthesis, precursor uptake and cyclic AMP production in isolated rat thymocytes. *Biochim Biophys Acta*, 852, 234-243.
- Sobotta, J., Becher, H.,** (1972) Verdauungsapparat. In: *Atlas der Anatomie des Menschen*, 2 (Ed. by H. Ferner, J. Staubesand), 61-143. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien.
- Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., Murthy, V.N.,** (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, 5, 239-246.
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., Rotin, D.,** (1997) Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J*, 16, 6325-6336.
- Strabel, D., Diener, M.,** (1995) Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol*, 274, 181-191.

- Su, Y., Zharikov, S.I., Block, E.R.,** (2002) Microtubule-active agents modify nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282, L1183-1189.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., Tomita, F.,** (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{2+} dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 135, 397-402.
- Taylor, C.W., Broad, L.M.,** (1998) Pharmacological analysis of intracellular Ca^{2+} signalling: problems and pitfalls. *Trends Pharmacol Sci*, 19, 370-375.
- Toeplitz, B.K., Cohen, A.I., Funke, P.T., Parker, W.L., Gougoutas, J.Z.,** (1979) Structure of ionomycin-a novel diacidic polyether antibiotic having high affinity for calcium ions. *Journal of the American Chemical Society*, 101, 3344-3353.
- Tosteson, M.T., Wieth, J.O.,** (1979) Tributyltin-mediated exchange diffusion of halides in lipid bilayers. *J Gen Physiol*, 73, 789-800.
- Ussing, H.H., Zerahn, K.,** (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 23, 110-127.
- Vaughan, P.C.,** (1987) Chloride-thiocyanate interactions in frog muscle anion-conducting channels at pH 5. *Pflugers Arch*, 410, 153-158.
- Wang, Y., Newton, D.C., Marsden, P.A.,** (1999) Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol*, 13, 21-43.
- Wilkinson, S.E., Hallam, T.J.,** (1994) Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? *Trends Pharmacol Sci*, 15, 53-57.
- Wilson, K.T., Xie, Y., Musch, M.W., Chang, E.B.,** (1993) Sodium nitroprusside stimulates anion secretion and inhibits sodium chloride absorption in rat colon. *J Pharmacol Exp Ther*, 266, 224-230.
- Young, S.H., Ennes, H.S., Mayer, E.A.,** (1997) Mechanotransduction in colonic smooth muscle cells. *J Membr Biol*, 160, 141-150.
- Zaucke, F., Zoeltzer, H., Krug, H.F.,** (1998) Dose-dependent induction of apoptosis or necrosis in human cells by organotin compounds. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361, 386-392.
- Zhan, X., Li, D., Johns, R.A.,** (2003) Expression of endothelial nitric oxide synthase in ciliated epithelia of rats. *J Histochem Cytochem*, 51, 81-87.

X Danksagung

Ein herzliches Dankeschön allen, die mich während der Promotion unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Martin Diener** für die Überlassung des Themas bedanken. Seine unermüdliche Begeisterung für die Forschung war immer wieder motivierend. Die stete Bereitschaft, Fragen zu klären und Probleme zu lösen, war eine große Hilfe, die entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank an Herrn *PD Dr. Gerhard Schultheiß* für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung vor allem zu Beginn des Versuchsabschnitts,

an *Anne Siefjediers, Kirsten Brockmeier* und *Gundula Prinz*, die immer ein offenes Ohr für mich hatten,

an *Brigitta Brück, Bärbel Schmidt, Eva-Maria Haas* und *Alice Metternich*, die mir im Labor zur Seite standen,

an *Karl-Hermann Maurer* für die Hilfsbereitschaft zur Lösung technischer Probleme,

an *Michael Haas* für die gewissenhafte Pflege und Versorgung der Versuchstiere. Seine gute Laune hat so manchen Tag aufgeheitert.

Vielen Dank auch allen übrigen *Mitarbeitern des Instituts* und allen *Doktoranden*, für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Besonderen Dank gilt meinem Freund, *Jens Deppe*, für seine bedingungslose Unterstützung und Liebe,

meinem Bruder, *Dierk Hennig* und meiner Schwester, *Katja Hennig*, die während des Studiums und der Promotion immer für mich da waren,

sowie meinen Eltern, Hannelore und Otto Hennig, ohne sie wäre ich nie so weit gekommen!

XI Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5177-7



9 783835 095177 8 ⑦